ZUM ABBAU VON FIBRINOGEN

GERT VON ROSEN-
VON HOEWEL

1972

ZUM ABBAU VON FIBRINOGEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

GERT VON ROSEN-
VON HOEWEL

aus

Gumbinnen

1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Helmut Hörmann

2. Berichterstatter: Professor Dr. Hansjochen Autrum

Tag der mündlichen Prüfung: 5.7.1972

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Meinen lieben Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München, in der Zeit von Januar 1966 bis September 1969 durchgeführt.

Meinen verehrten Lehrern

Herrn Professor Dr. Hansjochen Autrum
und
Herrn Privatdozent Dr. Helmut Hörmann

möchte ich für ihre Unterstützung danken.

Außerdem danke ich Herrn Privatdozent Dr. H. Hörmann für die Anleitung zu dieser Arbeit und für die vielen Anregungen und Diskussionen.

Nicht zuletzt möchte ich an dieser Stelle alle Mitarbeiter des Institutes erwähnen, die mir jederzeit bereitwillig mit Rat und Tat zur Seite standen.

Inhaltsübersicht

A. Einleitung

I. Bestandteile des Blutes und ihre Aufgaben 1

II. Die Gerinnungsfaktoren

a. Das Gerinnungsschema 2

b. Fibrinogen 5

c. Fibrin 10

III. Spaltungen von Fibrinogen und Fibrin

a. Fibrinolyse 13

b. Andere Spaltungen 14

IV. Modellvorstellungen zum Fibrinogenmolekül 15

B. Problemstellung 17

C. Methodischer Teil

I. Das Ausgangsmaterial Fibrinogen

a. Reinheitsprüfung 19

b. Reinigung 20

c. UV-Spektroskopie 22

d. Konzentrationsbestimmungen 22

e. Quantitative Aminosäurenanalyse 24

II. S-sulfo-Derivate von Fibrinogen und Fibrin

a. Präparation 25

b. Präparative Isolierung der Polypeptidketten 27

α. Chromatographie an DEAE-Cellulose 28

ß. Chromatographie an CM-Cellulose 29

c. Analytische Untersuchungen der getrennten Fraktionen von S-sulf-Fibrinogen

α. N-terminale Aminosäuren 32

ß. Zuckerbestimmungen 35

III. Elektrophorese an Polyacrylamidgel

a. Allgemeines 36

b. Besonderheiten der Elektrophorese an Polyacrylamidgel 37

c. Elektrophorese von Fibrinogen und seiner S-sulf-Derivate 39

d. Disk-Elektrophorese der chromatographisch isolierten S-sulf-Derivate von Fibrinogen 42

e. Disk-Elektrophorese von sulfitolysiertem Fibrin 44

IV. Mit Kupferäthylendiamin behandeltes Fibrinogen
a. Vorbemerkungen 45
b. Präparation 46
c. UV-Spektroskopie 47
d. Spezifität der Spaltung 48
e. Disk-Elektrophorese 49
f. Ionenaustauschchromatographie 51
g. Änderungen der Präparationsbedingungen 52
h. Reinigung mit Gelfiltration 52
i. Analytische Untersuchungen
α. Aminosäurenanalysen 53
ß. Zuckerbestimmungen 54
V. S-sulf-Derivate von Kupferäthylendiamin behandeltem Fibrinogen
a. Vorbemerkungen 55
b. Isolierung der Proteinanteile 56
c. Disk-Elektrophorese 58
d. N-terminale Aminosäurenanalysen 59
e. Molekulargewichtsbestimmungen 60
D. D i s k u s s i o n 64
E. E x p e r i m e n t e l l e r T e i l
1. Fibrinogengewinnung aus Rinderblut und Fibrinogenreinigung 72
2. Konzentrationsbestimmung 74
3. Aminosäurenanalyse 75
4. Tyrosin- und Tryptophanbestimmung 76
5. Sulfitolyse 77
6. Ionenaustauschchromatographie 78
7. N-terminale Aminosäureanalyse 80
8. Hexosenbestimmung 82
9. Disk-Elektrophorese 82
10, Präparation von Cu-I-Fibrinogen 85
11. Gelfiltration an Sephadex G-200 85
12. Glucosaminbestimmung 86
13. SDS-Disk-Elektrophorese 86
F. Z u s a m m e n f a s s u n g 88
G. A n h a n g 91
H. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s 92

A. Einleitung.

I. Bestandteile des Blutes und ihre Aufgaben.

Die Komplexität der höchstentwickelten Lebewesen in ihren physiologischen Leistungen und Verhaltensweisen ist in einem komplizierten Aufbau des Organismus begründet, bestehend aus einer Vielzahl hochspezialisierter Zellen und Organe mit ganz spezifischen Funktionen. Die Korrelation der Lebensvorgänge auf humoraler Basis, die Zufuhr von Baustoffen zu den "chemischen Fabriken" zur Erhaltung von Metabolismus und von Wachstum, die Abfuhr von Abfallstoffen und Giften und die Bereitstellung von Sauerstoff zur Energiegewinnung in der Atmungskette, stellt ein ungeheures Transportproblem dar. Seine Aufgabe wird vom Blutgefäßsystem wahrgenommen, in dem entsprechend der Vielfalt der Aufgaben eine Vielzahl von Bestandteilen in einem Flüssigkeitsstrom (in seiner Gesamtheit Blut) bewegt werden, die somit relativ schnell an den Ort ihrer Aufgabe gelangen können.

Aus dem Blut lassen sich partikuläre Bestandteile durch Zentrifugieren abtrennen, u.a. Erythrocyten (O_2- und CO_2-Transport) und Leucocyten ("Gesundheitspolizeifunktionen"). Im Überstand (= Plasma) befinden sich neben anorganischen Substanzen verschiedene Proteine gelöst. Ihre Menge beträgt beim Menschen 4% des Blutes (1). Albumin bestreitet die Hälfte davon. Es hat Bedeutung für die Osmoregulation und übernimmt Transportaufgaben. Außerdem stellt es eine Proteinreserve dar. Die zweitstärkste Fraktion stellen die Immunoglobuline (γ-Globuline), die sich an körperfremde Proteine und bakterielle Antigene binden, sie ausfällen und sie dadurch unschädlich machen. Lipoproteine können wasserunlösliche Fette und Lipide binden und transportieren. Das Gerinnungssystem mit seinen verschiedenen Faktoren sorgt für eine Abdichtung des Gefäßsystems.

Verschiedene Methoden, die Plasmaproteine präparativ zu trennen, arbeiteten Cohn und Mitarbeiter aus (2). Als wichtigstes Fällungsmittel wurde Alkohol verwendet. Durch Variation von Temperatur, pH, Ionenstärke und Proteinkonzentration wurde dabei die Löslichkeit der Proteine zusätzlich beeinflußt. Es wurden sechs Hauptfraktionen erhalten. Häufig wurde nach der Methode-6 gearbeitet. In Fraktion-I nach dieser Methode sind zahlreiche Faktoren des Gerinnungssystems enthalten, der größte Teil des Fibrinogens, daneben antihämophiles Globulin, kaltunlösliche Globuline und in geringen Konzentrationen Plasminogen und Prothrombin.

II. Die Gerinnungsfaktoren.

Erhalt der Funktionstüchtigkeit des Blutgefäßsystems und sein Schutz vor Verletzungen ist für seinen Träger von lebenswichtiger Bedeutung. Gefahren infolge von Verletzungen können durch zwei Mechanismen beseitigt werden:

1. Thrombocyten, ein dritter zellulärer Bestandteil des Blutes, verkleben an einer Wunde und bilden einen hämostatischen Pfropf. Dieser zieht sich durch Wirkung eines kontraktilen Eiweißes, Thrombostenin, zusammen und schließt kleinere Wunden.

2. An größeren Wunden gerinnt das Blut. Es scheidet sich unlösliches Fibrin ab, das die Wunde verschließt. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dieser zweiten Möglichkeit.

a. Das Gerinnungsschema.

Von umfassender Bedeutung ist die Blutgerinnung. Bei Verletzung des Gefäßsystems manifestiert sie sich in der Bildung eines Blutgerinnsels, das von einem unlöslichen Fasernetzwerk aus Fibrinpolymeren gebildet wird, in dessen Zwischenräume partikuläre Bestandteile eingeschlossen werden. Fibrin wird aus der Vorstufe Fibrinogen, einem

löslichen Plasmaprotein, unter Einwirkung eines proteolytischen Enzyms, Thrombin, gebildet. Thrombin liegt normalerweise in einer inaktiven Vorstufe, Prothrombin, im Blut vor. Im Bedarfsfalle kann es in zweierlei Weise aktiviert werden:

1. Ein sog. äußeres (extrinsic) Gerinnungssystem. Nach einer Gewebsverletzung leitet ein Faktor aus den umgebenden Geweben, also ein in Bezug auf die Blutgefäße von außen stammendes plasmafremdes Enzym, die Gewebsthrombokinase, die Aktivierung einer Enzymkette ein. Über die Faktoren Prokonvertin, Stuart-Power-Faktor und weitere Gerinnungsfaktoren des Plasmas wird Prothrombin zu Thrombin aktiviert.

2. Bei Verletzung der Aderinnenwand oder auch bei Berührung mit Luft wird auf Grund des Kontaktes des Blutes mit einer fremden Oberfläche ein plasmaeigenes, inneres Enzym, der Hagemannfaktor als Starter einer zweiten Enzymkette aktiviert. Dieses innere (intrinsic) Gerinnungssystem führt über mehrere Faktoren zu einer Aktivierung des Stuart-Power-Faktors und mündet damit in das zuerst genannte System ein.

Die beiden Gerinnungssysteme stellen Reaktionsketten dar,

Tabelle 1. Namen und Nummern der Gerinnungsfaktoren.

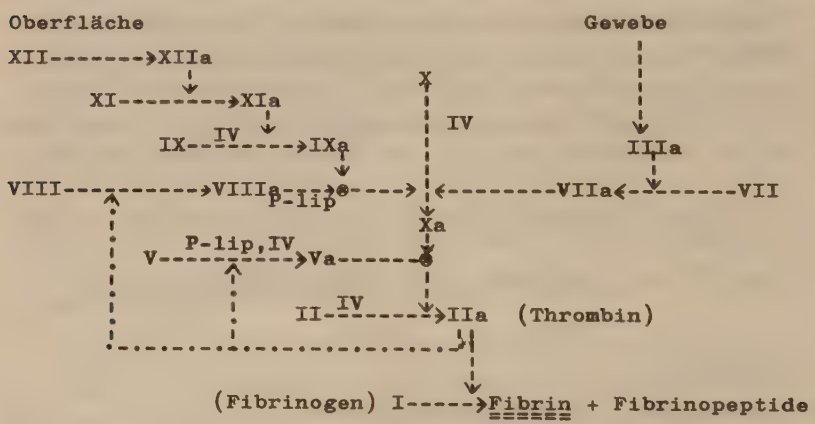
Namen	Nr.
Fibrinogen	I
Prothrombin	II
(Thromboplastin, Gewebsthrombokinase)	III
Kalzium Ionen	IV
Proaccellerin,(Accellerin = Va)	V,(VI)
Prokonvertin, Autoprothrombin I*	VII
Antihämophiles Globulin (-Faktor), AHF, Platelet Cofaktor I	VIII
Plasma Thromboplastin Component, PTC, Christmas Faktor, Platelet Cofaktor II, Autoprothrombin II*	IX
Stuart Power Faktor	X
Plasma Thromboplastin Antecedent, PTA	XI
Hagemann Faktor, HF	XII
Fibrinstabilisierender Faktor, FSF	XIII

* = Bezeichnung nach Seegers, a = aktivierte Form.

in denen jeweils ein vorgelagertes Enzym das nachfolgende aktiviert (Kaskadensystem). In bestimmten Fällen schreitet der Kettenprozeß erst fort, wenn ein aktives Enzym mit einem weiteren Faktor einen Komplex an einer Lipoproteidoberfläche gebildet hat. Bei mehreren Schritten ist die Gegenwart von Kalziumionen nötig (bezüglich einer Übersicht siehe 3).

Das Zusammenwirken der verschiedenen Gerinnungsfaktoren geht aus Schema I hervor. Darin sind die inaktiven Faktoren mit römischen Ziffern bezeichnet (Tabelle 1, Seite 3). Die aktiven wurden durch ein angehängtes a kenntlich gemacht.

Schema I. Das Gerinnungssystem (Kaskadenschema).



---→ = Bildung eines aktiven Komplexes, a = aktiv,

-·-·→ = verstärkte Thrombinbildung durch Rückkopplung,

P-lip = Phospholipid.

Eine Auslösung des Gerinnungssystems führt zu einer Aktivierung von Thrombin. Diese Protease wandelt Fibrinogen in Fibrin um, das ein unlösliches Fasernetzwerk bildet. Gleichzeitig wirkt Thrombin aber wieder aktivierend auf mehrere

Gerinnungsfaktoren (V, VIII). Dadurch kommt es zu einem autokatalytischen Prozeß, der in einer Bereitstellung großer Thrombinmengen besteht. Nur unter diesen Voraussetzungen kann sich ein Gerinnsel wirkungsvoll bilden.

Im einzelnen ist die Anordnung des Schemas und die Existenz einiger Gerinnungsfaktoren noch nicht ganz geklärt und etwas umstritten. Aus verschiedenen Hypothesen, z.B. die erweiterte klassische Theorie (4), die mehr vom diagnostischen Standpunkt arbeitet (siehe auch 5), ragt die Vorstellung von Seegers (6) heraus. Er nimmt an, daß Prothrombin ein multifunktionelles Komplexmolekül ist, aus dem verschiedene Gerinnungsfaktoren entstehen können. Ein zentraler Protein- und Kohlenhydratpool soll neben kleineren Fragmenten Autoprothrombin und Thrombin abspalten. Einzelne Prothrombinfragmente können hemmend oder aktivierend auf die Thrombinaktivierung wirken. So sollen einige Gerinnungsfaktoren, Faktor VII, IX und X im Prothrombin präformiert sein. In Übereinstimmung damit kann Hämophilie-B (Faktor IX Mangel) durch Gaben von Autoprothrombin-C korrigiert werden (7,8). Die Meinung von Seegers ist jedoch in vielen Punkten umstritten und wird in neuerer Zeit eher abgelehnt.

b. Fibrinogen.

Fibrinogen stellt als Substrat für Thrombin das wichtigste Glied in der Gerinnungskette dar. Synthetisiert wird es in den Parenchymzellen der Leber, aus deren Mikrosomenfraktion es isoliert werden kann (9). Im Rinderblut erreicht es eine Konzentration von 3,7 g/Liter (10). Seine biologische Halbwertzeit beträgt 4 - 6 Tage (11). Neben seinem Hauptvorkommen im Plasma existiert es in den Lymphgängen, im Bindegewebe und im Interstitialraum.

Fibrinogen ist ein globuläres Protein. Angaben verschiedener Autoren zu seinem Molekulargewicht weichen stark voneinander ab. Werte zwischen 330 000 und 540 000 wurden mit

Ultrazentrifugenläufen oder Lichtstreuung bestimmt. Am besten gesichert gilt ein Mol-Gewicht von 330 000 - 340 000. Die vielen stark überhöhten Meßwerte hängen mit einigen, von den meisten globulären Proteinen abweichenden Eigenschaften des Fibrinogens zusammen. Es ist schwer löslich in Lösungen niederer Ionenstärke, bei höherer Ionenstärke neigt es zur Polymerenbildung und wird viskos, was die Sedimentationskonstante erhöht.

Im Elektronenmikroskop erscheint Fibrinogen als ein längliches Gebilde von drei linear angeordneten Kugeln (12). Daneben fand man perlschnurartige Moleküle mit vier und mehr Kugeln (13), die offensichtlich durch Anlagerung von Molekülfragmenten bei der Präparation entstanden sind. Nach dem am besten anerkannten Modell von Hall und Slayter (12) sollen die Kugeln durch dünne Stege miteinander verbunden sein. Die beiden äußeren haben einen Durchmesser von je 65 Å, die innere von 50 Å. Die Stege sollen 15 Å dick sein. Die Moleküllänge beträgt ca. 475 Å. Ein ähnliches Modell entwikkelte Bang (14) mit drei identischen Rotationsellipsoiden ohne Stege. Ganz abweichend davon ist das Modell von Köppel (15), der polyedrische Gebilde als Pentagondodekaeder deutete (Breite = 250 Å), wobei die Proteinketten als Doppelstranghelices in den Kanten verlaufen sollen. Karges (16) konnte nachweisen,daß es sich hierbei um Kontrastfärbungsartefakte handelte.

Der komplizierte Bau des Moleküls erschwert die Bestimmung der Primärstruktur erheblich. Im Fibrinogen aus Rinderserum wurden als C-terminale Aminosäuren vier Moleküle Valin und zwei Moleküle Prolin gefunden (17, 18, 19). N-terminal liegen je Fibrinogenmolekül zwei Reste Glutaminsäure,zwei Reste Tyrosin und zwei Reste Pyrrolidonkarbonsäure vor (20). Letztere ist ein Abkömmling der Glutaminsäure und direkt nicht mit den N-terminalen Bestimmungsmethoden zu erfassen, da die Aminogruppe nicht frei, sondern unter Ringbildung mit der Carboxylgruppe säureamidartig verbunden ist.

Aus den Ergebnissen der Endgruppenbestimmung an Fibrinogen und Fibrin (siehe unten) wurde geschlossen, daß Fibrinogen aus drei verschiedenen Polypeptidketten besteht, die paarweise vorliegen (21). Diese Vorstellung wurde durch Clegg und Bailey (22) bestätigt, als sie mit Sulfit Disulfidbrücken, die die Ketten zusammenhalten, spalteten und in der Elektrophorese drei verschieden wandernde Fragmente erhielten (23). Eine Proteinkette trug N-terminal Glutaminsäure, die zweite Pyrrolidonkarbonsäure und die dritte Tyrosin (24). Die Molekulargewichte der drei Einzelketten liegen zwischen 47 000 und 65 000 (25, 26, 27). Ihre Summe bestreitet gewichtsmäßig nur die Hälfte des Gesamtmoleküls. Molekulargewichtsbestimmungen und quantitative N-terminale Aminosäureanalysen geben somit zu der Vorstellung Anlaß, daß das Fibrinogenmolekül einen dimeren Aufbau hat.

Bei Inkubation mit Thrombin wird vom Aminoende der Peptidketten mit N-terminaler Glutaminsäure das sog. Fibrinopeptid A und von den Peptidketten mit N-terminaler Pyrrolidonkarbonsäure das Fibrinopeptid B abgespalten*. Das Peptid A hat das Molekulargewicht 2 000, Peptid B 2 700. Die Aminosäuresequenzen waren bald bekannt (28, 29):

Peptid A (Rind): Glu-Asp-Gly-Ser-Asp-Pro-Pro-Ser-Gly-Asp-Phe-
-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-.

Peptid B (Rind): Pyr-Phe-Pro-Tyr-Asp-Tyr($O\text{-}SO_3H$)-Asp-Glu-Gly-Gln-Asp-
-Asp-Arg-Pro-Lys-Val-Gly-Leu-Gly-Ala-Arg-.

---

* Durch das Internationale Komitee für Hämostasis und Thrombosis (Washington 1967) wurde folgende Nomenklatur festgelegt: die abgespaltenen zwei Peptide werden mit A und B bezeichnet, der Rest der Polypeptidketten mit α bzw. β. Im ungespaltenen Zustand lautet die Schreibweise α(A) und β(B). Die dritte, thrombolytisch nicht veränderte Kette hat die Bezeichnung γ erhalten (siehe auch Abbildung 1, Seite 11).

Bemerkenswert ist die hohe Anzahl saurer Aminosäuren in den Fibrinopeptiden: von den 19 Resten des Peptid A sind drei Reste Asp und zwei Glu, von den 21 Resten des Peptid B sind vier Reste Asp, ein Rest Glu und einer Tyr-O-Sulfat.

Inzwischen sind die Sequenzen der Fibrinopeptide von zahlreichen Säugetieren aufgeklärt (30). Sie weisen starke Unterschiede auf, wesentlich mehr als die Speziesunterschiede anderer Proteine. Während z.B. die Aminosäuren in Cytochrom C sich bei Säugern wenig unterscheiden, nämlich nur 9% von ihnen, so differieren bis zu 80% der Aminosäuren bei den Fibrinopeptiden. Blombäck und Mitarbeiter versuchten daraufhin an Hand der Ähnlichkeit von Sequenzen der Fibrinopeptide verschiedener Tiere phylogenetische Beziehungen aufzustellen (31, 32).

Weiter in das Molekül hineinreichende Sequenzen wurden bestimmt, als es gelang, von den α(A)- und ß(B)-Ketten größere N-terminale Peptide mit Plasmin abzuspalten (33). Einen erheblichen Fortschritt brachte der Befund, daß Bromcyan von Fibrinogen ein Bruchstück (Mol-Gewicht 26 000) abspaltet, das die aminoendständigen Bereiche der drei Peptidketten über Disulfidbrücken vernetzt enthielt. Daraus wurden die Kettenbruchstücke freigelegt und durch jeweils eins der Enzyme Trypsin, Chymotrypsin oder Thrombin in kleinere Fragmente zerlegt. Diese wurden in ihrer Sequenz aufgeklärt. Die Überlappungsstellen der mit den verschiedenen Spaltungsmethoden erhaltenen Fragmente konnten zur Rekonstruktion der Sequenzen des ursprünglichen Bruchstücks benutzt werden (34). Aminosäuresequenzen von Humanfibrinogen siehe Anhang, Seite 91.

Im Zuge dieser Untersuchungen gelang die Feststellung, daß eine bestimmte Blutungskrankheit - kongenitale Dysfibrinogenämie -, die bei einer Familie in Detroit aufgetreten war, in einem molekularen Defekt des Fibrinogens zu suchen ist. Es ergab sich, daß bei Fibrinogen Detroit eine Aminosäure, Arg in Position 19 der α(A)-Kette, gegen eine neutrale Aminosäure (Ser?) ausgetauscht war (35).

Die drei Polypeptidketten sind über Disulfidbrücken vernetzt, die zu einem Teil in dem erwähnten terminalen Abschnitt des Moleküls mit einem Mol-Gewicht von 26 000 lokalisiert sind. Hier befindet sich ein Drittel der Cystin-Reste, die mehrere, nahe benachbarte Disulfidbrücken ausbilden. Es liegt ein sog. Disulfidknoten vor (36). Der ganze Abschnitt enthält knapp 30 S-S-Brücken (37).

Im Fibrinogen kommen geringe Mengen an Kohlenhydraten vor. Es handelt sich um Hexosen und zwar Glucose und Galactose (38) und Spuren von Xylose (39), desweiteren um Glucosamin und Neuraminsäure (40, 41, 42). Die Gehaltsangaben in der Literatur schwanken stark. Ziemlich ausführliche Untersuchungen stammen von Hörmann und Gollwitzer (43). Sie fanden folgende Werte:

	Hexosen (%)	Glucosamin (%)	Neuraminsäure (%)
Fibrinogen	1,56	0,58	0,48
Fibrin	1,57	0,62	0,47

Die γ-Kette enthält mit 1,5% ungefähr so viel Hexosen wie das Gemisch aus ß(B)- und α(A)-Ketten mit 1,7%, sie hat aber nur die Hälfte an Neuraminsäure (0,4% gegenüber 1,0%) (44).

In früheren Arbeiten wurde irrtümlich eine Abnahme des Hexosen- und Neuraminsäuregehaltes beim Übergang zum Fibrin festgestellt (45). Daran wurde die Vorstellung geknüpft, daß die Kohlenhydrate an der Fibrinbildung beteiligt seien. Neue Befunde ergaben aber, daß Fibrinogen und Fibrin den gleichen Kohlenhydratgehalt besitzen (43, 46). Die Höhe der Meßwerte hängt zum einen von der Reinheit der Chargen ab, zum anderen verfälscht die Gegenwart von Tryptophan die Bestimmungen (47).

Über die Anordnung der Kohlenhydrate im Fibrinogen ist folgendes bekannt: Mester und Mitarbeiter (48) und Haschemeyer

und Mitarbeiter (49) isolierten nach Pronaseabbau des Fibrinogens einige wenige Glycopeptide, die die Hauptmenge der Kohlenhydrate enthielten. Die zweite Arbeitsgruppe bestimmte die Aminosäuresequenz der Peptide, an die die Kohlenhydrate gebunden sind:

1. NH_2-Asp(CHO)-Lys-COOH, 2. NH_2-Gly-Glu-Asp(CHO)-COOH,

3. NH_2-Glu(CHO)-Asp-Lys-COOH.

3. dürfte ein Teilstück von 2. sein. Spaltungen mit Pronase sind sehr problematisch; diese spaltet wenig spezifisch.

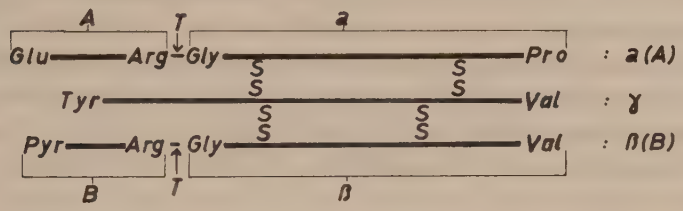
Nach diesen Befunden liegen die Kohlenhydrate als Oligosaccharide vor, die wahrscheinlich N-glycosidisch an den Amidstickstoff von Asparaginresten gebunden sind. In den γ-Ketten befindet sich die Kohlenhydratgruppierung nahe dem Aminoende. Man vermutet, daß sie an den Asparaginrest in Stellung 52 gebunden ist (50).

c. Fibrin.

Die Bildung des unlöslichen Fibrinfasernetzwerkes vollzieht sich in drei Schritten (Schema IIa, Seite 13):

1. Wie schon angedeutet geht aus Fibrinogen unter proteolytischer Abspaltung der Fibrinopeptide Fibrin-Monomer hervor (Fin_m). Kinetische Messungen ergaben, daß zuerst der Gehalt an N-terminaler Glutaminsäure, später der an Pyrrolidonkarbonsäure abnimmt; es erscheint in äquimolaren Mengen Glycin als neue Endgruppe. Unverändert bleibt die Endgruppe Tyrosin erhalten (20). Fibrinopeptid A wird leichter als Fibrinopeptid B abgespalten. Die C-terminalen Aminosäuren der beiden Fibrinopeptide A und B sind Arginin; die Thrombinwirkung ist hier hochspezifisch: es spaltet nur die Bindung Arg-Gly zwischen den Fibrinopeptiden und dem restlichen Molekül (siehe Abbildung 1, nächste Seite). Ein Enzym des Giftes der Lanzenviper, Reptilase, spaltet von

Abbildung 1. Spaltung eines Fibrinogenhaplomers durch Thrombin.



T⟶ = Thrombolyse Stelle.

Fibrinogen nur das A-Peptid ab (51). Sehr langsam wird Fibrinogen von Thrombin zusätzlichzwischen Arg und Val in Stellung 19-20 der α(A)-Ketten angegriffen (33).

Das entstandene Fibrin-Monomer besitzt nach Verlust der stark negativen Peptide eine veränderte Gesamtladung, das Dipolmoment bleibt jedoch unverändert (52). Die N-terminalen Abschnitte der Polypeptidketten müssen demnach symmetrisch zum Molekülmittelpunkt angeordnet sein.

2. Nach Entfernung der Fibrinopeptide sind die Abstoßungskräfte zwischen den einzelnen Molekülen herabgesetzt, es findet unter gegenseitiger Absättigung elektrostatischer Ladungen und Bildung von intermolekularen Wasserstoffbrükken eine Aggregation zu fibrillären Fibrinpolymeren statt. Als Donatoren für H-Brücken kämen Tyrosyl- und Lysyl-Reste, als Acceptoren Histidyl-Reste in Frage (53, 54). In Wasserstoffbrücken sprengenden Agenzien wie Harnstofflösungen (30%) ist dieses polymere Fibrin löslich (Fin_s, s =soluble).

3. Der Endpunkt der Blutgerinnung ist erreicht mit der Bildung eines Fibrinpolymeren, das in alkalischer Harnstofflösung unlöslich ist (Fin_i, i = insoluble). Durch Einwirkung von Thrombin und Kalziumionen ist auch der Gerinnungsfaktor XIII aktiviert worden. Unter seinem Einfluß bilden

sich Quervernetzungen zwischen benachbarten Fibrinmolekülen aus, indem er als Transpeptidase wirkend unter Ammoniakabspaltung die γ-Karboxylgruppe einer Glutaminseitenkette mit der ε-Aminogruppe eines Lysinrestes amidartig kovalent verknüpft (55). Orte dieser intermolekularen Vernetzung sind die γ-Ketten zweier Fibrin-Monomere. Nach Sulfitspaltung von Fin_i können dimere γ-Ketten nachgewiesen werden (56, 57, 58). Ob α-γ- und α-α-Vernetzungen ebenfalls vorkommen, ist umstritten (59, 60).

Im Elektronenmikroskop lassen sich mehrere Gerinnungsstadien unterscheiden:

1. Fibrin-Monomere sind zu langen Polymeren (End an End Anlagerung) mit einfachem Moleküldurchmesser aggregiert. Die einzelnen Kugeln sind zu identifizieren. Ihre Abfolge ist gedrängter als im Fibrinogenmolekül.

2. Es bilden sich Doppelstränge (Subfibrillen) aus Polymeren aus. Unter stark quellenden Bedingungen zeigt sich längs der Mitte eine Aufhellung, die Stränge bleiben im übrigen fest verbunden. Kugeln sind nicht mehr erkennbar (61).

3. Durch seitliche Zusammenlagerung von Subfibrillen entstehen die eigentlichen, hochgeordneten Fibrillen. Sie weisen eine charakteristische Querstreifung mit einer Periode von 230 Å auf. Bemerkenswert ist, daß unter besonderen Versuchsbedingungen auch Fibrinogen kurze Fibrillen mit gleicher Querstreifung wie Fibrin ausbildet (62).

Es ist bis heute noch nicht gelungen, eine experimentell belegbare Vorstellung zu entwickeln, wie die Fibrin-Monomere in die Fibrinfibrille eingelagert sind. Die Schwierigkeit besteht darin zu erklären, warum die hochgeordneten Fasern eine Querstreifungsperiodizität halber Monomerenlänge besitzen (12, 16, 63, 64).

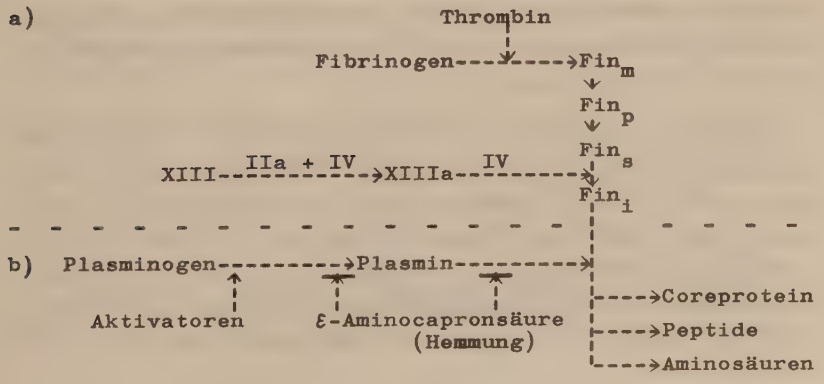
III. Spaltungen von Fibrinogen und Fibrin.

a. Fibrinolyse.

Mit der Bildung von Fibrinfibrillen ist der Metabolismus des Fibrinogens noch nicht beendet. Die Aufgabe von Fibrin ist nach Einwachsen von spezifischem Heilgewebe in die Wunde erfüllt; es steht einer vollkommenen Heilung geradezu im Wege. Was Fibrinogen anbelangt, so ist seine kurze biologische Halbwertzeit nur verständlich, wenn ein Abbaumechanismus existiert, der dieses Protein verdaut, sei es direkt oder indirekt, nachdem es in Fibrin umgewandelt wurde (latente Gerinnung).

Das zentrale Enzym für den Abbau (Fibrinolyse) von Fibrinogen und Fibrin ist Plasmin, die aktive Form der Vorstufe Plasminogen. Letzteres hat eine starke Affinität zu Fibrinogen, so daß es Schwierigkeiten bereitet, Plasminogen freies Fibrinogen herzustellen. Plasminogen wird von Gewebsaktivatoren, von Urokinase und vielleicht auch von Gerinnungsfaktor XII (65) in Plasmin umgewandelt, das Fibrinogen in kleinere Bruchstücke spaltet (Schema IIb).

Schema II. Fibrinbildung a), Fibrinolyse b), letztere nach Rickli (72).



Hemmend wirken auf Plasmin u.a. Antiplasmin, ε-Aminokapronsäure und indirekt Kalziumionen ein (66). Plasmin baut Fibrinogen an mindestens 42 Stellen ab. Triantaphyllopoulos und Mitarbeiter (67) konnten im Abbaugemisch mindestens 26 Peptide und 12 Reste freier Aminosäuren pro Mol isolieren, hauptsächlich Lysin und Arginin. An hochmolekularen Bruchstücken wurden im Verlauf der Proteolyse von Budziński und Mitarbeitern (68) und von Marder (69) vier verschiedene Fragmente festgestellt: X, Y, D und E, deren letzteres am schnellsten kathodisch in der Stärkegelelektrophorese wanderte. In einem frühen Stadium traten die thermolabilen Fragmente X und Y auf. Ersteres ist noch gerinnbar, während dem letzteren eine hohe gerinnungshemmende Wirkung zugeschrieben wird. Zuletzt blieben Fragment D (MW= 85 000) (70, 71) und E erhalten (MW = 35 000). Sie stellen die Endprodukte der Fibrinolyse dar. Sulfitolysierung unterteilte Fragment D in drei Untereinheiten, vielleicht Reste der α-, ß- und γ-Ketten; Fragment E enthielt keine interchänare Disulfidbrücken.

b. Andere Spaltungen.

Antikoagulant wirkende Bruchstücke wurden auch bei Inkubation von Fibrinogen mit Trypsin (73) und Chymotrypsin (74) erzielt. Es entstehen zunächst drei hochmolekulare Bruchstücke A, B und C, von denen nach erschöpfendem Abbau nur noch C übrigbleibt (MW = 100 000), nachdem A in B und C, B in C + Peptide aufspaltete (16).

Von Schauenstein und Mitarbeitern (75) wurde Fibrin durch Inkubation mit Kupferäthylendiamin (CuÄDA) in zwei Fragmente gespalten. Die größere Fraktion-I wies ein dem Fibrinogen ähnliches Absorptionsspektrum auf. Dagegen unterschied sich Fraktion-II von beiden Proteinen u.a. durch Fehlen eines Absorptionsmaximums im Bereich von 280 mμ, das für Tyrosin und Tryptophan charakteristisch ist.

IV. Modellvorstellungen zum Fibrinogenmolekül.

Des öfteren wurde versucht, an Hand der bis dato bekannten Tatsachen ein Bild von der Primär- und Tertiärstruktur des Fibrinogens zu entwerfen.

Ein sehr frühes Arbeitsmodell stammt von Schauenstein und Hochenegger (76). Sie nahmen an, daß die Proteinketten nicht durchgehend peptidisch verknüpft sind. Sie stützten sich auf den Befund, daß oberhalb pH = 12,9 Fibrinogen papierelektrophoretisch in zwei Fragmente aufgetrennt werden konnte (77). Die Autoren nahmen an, daß eine gleichartige Fraktionierung schon bei einem pH = 11,6 stattfindet, wo Wasserstoffbrücken, an denen Tyrosinreste beteiligt sind, aufbrechen und wo denaturiertes Fibrinogen noch teilweise renaturierbar ist. Der Vergleich mit Fibrin, das ebenfalls unter Steigerung der Tyrosindissoziation von CuÄDA in Fraktion-I und -II gespalten wird, führte zu der Vorstellung, daß zwei verschiedene Untereinheiten im Molekül präformiert sind, die durch Wasserstoffbrücken vernetzt sind - Donator ist Tyrosin (siehe Abb. 2a, Seite 16).

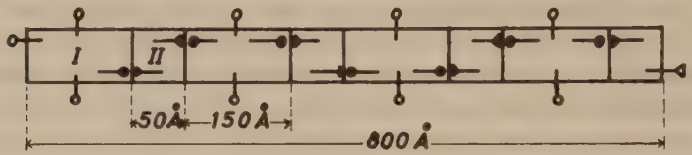
Ein zweites Modell von Budziński und Mitarbeitern (78) stimmt zwar mit physikalischen Meßdaten überein. Aber den dimeren Aufbau stellten sie sich so vor, als bestände das Molekül aus zwei Proteinhauptsträngen in antiparalleler Anordnung, in denen jeweils die drei verschiedenen Polypeptidketten hintereinander geschaltet liegen (Abb. 2b, Seite 16).

In dem heute am meisten anerkannten Modell von Blombäck (36) wird die zentrosymmetrische Molekülform berücksichtigt. Nicht nur das N-terminale Ende der α(A)-Kette, sondern auch das der ß(B)-Kette, im Gegensatz zu den Hypothesen von Laki und Budziński, liegt zusammen mit dem der γ-Kette im terminalen Abschnitt des Moleküls (Abb. 2c, Seite 16). Alle drei Ketten sind im N-terminalen Bereich

durch mehrere Disulfidbrücken (Disulfidknoten) verknüpft. Wo weitere Vernetzungen der drei Polypeptidketten im Innern des Moleküls sind und wie sich die Ketten überhaupt auf Kugeln und Stege verteilen, ist noch völlig ungeklärt.

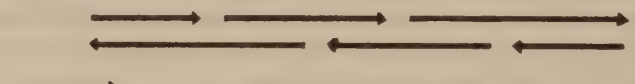
Abbildung 2. Molekülmodelle des Fibrinogens.

a. nach Schauenstein und Hochenegger (76).



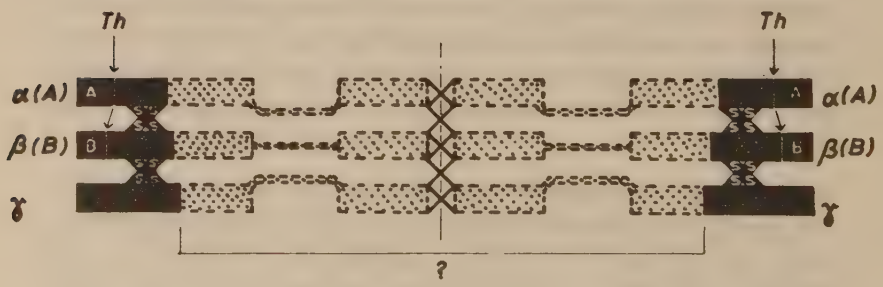
freie / gebundene } Oxyphenylgruppen, freie / gebundene } X-Gruppen.

b. nach Budziński (78).



= eine Polypeptidkette.

c. nach Blombäck (36).



B. Problemstellung.

Wie bereits in der Einleitung vermerkt, lagen zu Beginn meiner Arbeit zahlreiche Experimentalbefunde vor, die dafür sprachen, daß Fibrinogen drei verschiedene Arten von Peptidketten enthielt, von denen jede im Molekül zweimal enthalten ist. Die Methoden zur Trennung und Reindarstellung dieser Ketten waren jedoch nur unvollkommen ausgearbeitet und in unserer Arbeitsgruppe noch nicht eingeführt.

Es bestand somit zunächst die Aufgabe, bereits bekannte Trennverfahren für die einzelnen Peptidketten, die man nach selektiver Spaltung der intramolekularen Disulfidbindungen von Fibrinogen und Fibrin mit Sulfit erhält, auf ihre Anwendbarkeit zu prüfen sowie neue Verfahren zu entwickeln und einzuführen. Als bekannte Verfahren waren chromatographische Trennungen an verschiedenen Austauschern (DEAE-Sephadex, CM-Cellulose) beschrieben. Eine Neuentwicklung bot sich in der Gel-Elektrophorese an, die sich in vielen ähnlichen Fällen als sehr leistungsfähig erwiesen hatte. Die mit verschiedenen Methoden getrennten Fraktionen sollten einander zugeordnet und durch Bestimmung ihrer Aminoendgruppen charakterisiert werden. Auch wurde der Anteil an Hexosen in den Peptidketten bestimmt.

Die bei der Trennung der Peptidketten gewonnenen methodischen Erfahrungen sollten dann dazu verwendet werden, eine Spaltungsreaktion zu untersuchen, die Schauenstein und Mitarbeiter (75) für Fibrin beschrieben hatten, und die seitdem nicht mehr bearbeitet worden war. Bei Behandlung von Fibrin mit Kupferäthylendiamin (CuÄDA) erhielten die Autoren zwei Fraktionen, von denen die eine 75%, die andere 15% des Fibrins bestritt. In der ersten Fraktion soll nach spektroskopischen Ergebnissen das gesamte Tyrosin, in der zweiten relativ viel Arginin enthalten sein.

Es bestand die Aufgabe, die Spaltung nachzuarbeiten, wobei aus Zweckmäßigkeitsgründen Fibrinogen anstelle von Fibrin

eingesetzt wurde. Die Spaltprodukte sollten dann in ihre Peptidketten zerlegt und diese mit den entwickelten Methoden getrennt und zugeordnet werden. Aus den Ergebnissen sollten Aussagen über die Wirkung des Spaltreagens auf Fibrinogen gemacht werden.

C. M e t h o d i s c h e r T e i l

I. Das Ausgangsmaterial Fibrinogen.

a. Reinheitsprüfung.

Als Ausgangsmaterial dienten anfangs käufliches Fibrinogen der Behringwerke, einigemale solches der Firma Calbiochem, Los Angeles, USA. Beide Präparate sollen der Cohn-Fraktion I entsprechen.

Die Prüfung auf Einheitlichkeit wurde elektrophoretisch an Polyacrylamidgelen (Disk-Elektrophorese) vorgenommen*. Die elektrophoretische Mobilität des Fibrinogens war sehr gering. Es wanderte für eine Auftrennung ausreichend schnell nur dann in ein Gel ein, wenn dessen Konzentration an Polyacrylamid unter 7% lag. Als günstig erwies sich die Konzentration von 4%.

Das Fibrinogen der Behringwerke, im folgenden I_o-Fibrinogen bezeichnet, trennte sich in vier deutlich erkennbare Banden auf. Die unterste, breitere Hauptbande repräsentierte das eigentliche Fibrinogen, darüber lagen Verunreinigungen in drei Nebenbanden konzentriert (Abb. 3, Gel 1, Seite 21). Das Fibrinogen von Calbiochem, ebenfalls Cohn-I entsprechend, schien schonender gefällt worden zu sein. Es zeigte weniger hochmolekulare Begleiter, dafür noch Spuren von Plasmaproteinen. Unter der Fibrinogenbande waren wahrscheinlich ß-Globuline (zwei Banden) sichtbar und am weitesten gewandert Albumin (Abb. 3, Gel 2, Seite 21).

Um reproduzierbare Ergebnisse bei den analytischen Untersuchungen zu erhalten, mußte das Rohfibrinogen einem Reinigungsprozeß unterworfen werden.

---

* ausführliche Hinweise über Trennwirkung und Laufbedingungen der Disk-Elektrophorese siehe Seite 37.

b. Reinigung.

Die Reinigung erfolgte nach Blombäck et al. (79) in vier Schritten. Zunächst wurden Verunreinigungen gefällt, Fraktion I-1 (dieses Präzipitat wurde verworfen) und dann das Fibrinogen, Fraktion I-2, (der Überstand wurde verworfen). Das wieder aufgelöste Fibrinogen wurde erneut nach einem ähnlichen Schema fraktio-niert gefällt. Als Fällungsmittel diente Alkohol; während der Fällung der Verunreinigungen, Fraktion I-1 und I-3, wurde durch eine bestimmte Konzentration an Glycin das Fibrinogen optimal in Lösung gehalten. Das hochgereinigte Fibrinogen, Fraktion I-4, im folgenden I_4-Fibrinogen genannt, wurde in 0,3 M NaCl-Lösung gelöst und bei -20°C aufbewahrt (Schema der Reinigung siehe Seite 72).

Der erzielte Reinigungseffekt wurde auf zwei Wegen ermittelt:

1. Prüfung der Gerinnungsfähigkeit (methodische Hinweise siehe Abschnitt Id, Seite 22).

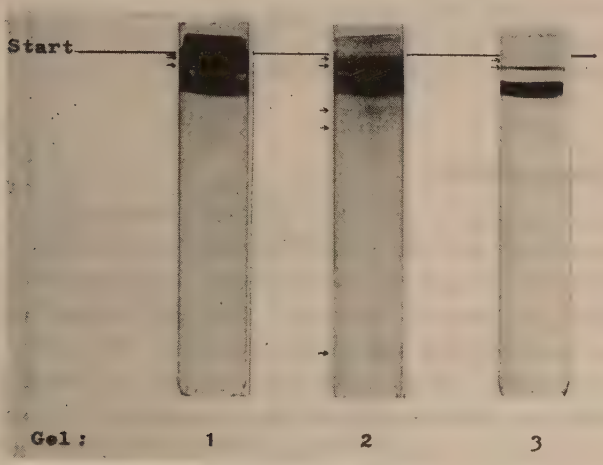
2. Elektrophorese an Polyacrylamidgelen.

Bei letzterer Methode zeigte sich, daß I_4-Fgen, gewonnen aus I_o-Fgen immer noch deutlich langsamer wandernde Verunreinigungen zeigte. Diese waren bei älteren I_4-Chargen relativ stärker. Auch ein nochmaliges Reinigen führte nicht zum Verschwinden der Nebenbanden. Es handelte sich offensichtlich nicht um fibrinogenfremde Verunreinigungen, sondern um Derivate des Fibrinogens selbst. In Frage kamen:

1. größere Moleküle, z.B. Polymere,
2. Bruchstücke mit geringerem Gehalt an sauren Aminosäuren.

Um die Reinheit von Fibrinogen zu verbessern, wurde später zur Darstellung direkt vom Blut ausgegangen. Nach Zentrifugieren und Abhebern des Plasmas wurde eine erste Fällung mit Glycin nach Mosseson et al. (80) in modifizierter Form

Abbildung 3. Disk-Elektrophorese von Fibrinogenproben unterschiedlicher Reinheitsgrade.



Elektrophorese bei pH = 9,2 im 4% Gel und bei 4 mA / Gel.
1 = I_0-Fgen (Behringwerke), 2 = Fibrinogen (Calbiochem),
3 = I_4-Fgen, direkt aus Blut gewonnen, → = Nebenbande.

vorgenommen. Die geforderte Endkonzentration an Glycin wurde von Mosseson durch Zugabe von festem Glycin erreicht. Fibrinogen begann jedoch bereits vor Erreichen der endgültigen Glycinkonzentration auszufallen, sodaß zwangsläufig ein Teil des sich sehr langsam lösenden Glycins im Präzipitat eingeschlossen wurde. Diese Menge würde die Glycin Konzentration bei den anschließenden Fällungen verfälschen (81). Es wurde daher eine berechnete Menge Glycin in einer gesättigten Lösung (bei 50°C) tropfenweise zum gekühlten Plasma hinzugegeben, so daß dessen Temperatur nie über 8°C stieg. Das Präzipitat entsprach in seinem Reinheitsgrad dem Fibrinogen von Calbiochem. Es wurde deshalb eine zweite Glycin Fällung angeschlossen. Der Niederschlag wurde schließlich in Citratpuffer gelöst, die kaltunlöslichen γ-Globuline gefällt (Stehenlassen im Kühlraum über Nacht)

und nach Blombäck und Blombäck (79) weitergereinigt. Die so erhaltene Fraktion I_4 wies bei einer elektrophoretischen Untersuchung zwar auch noch eine langsamer wandernde Nebenbande auf, diese trat aber erst bei einer relativ hohen Proteinkonzentration in Erscheinung (Abb. 3, Gel 3, Seite 21).

c. UV-Spektroskopie.

Die UV-Spektroskopie ist eine einfache Methode, die eine erste Charakterisierung einer Substanz gestattet. Proteine absorbieren allgemein im UV-Licht. Die Peptidbindungen absorbieren im Bereich von 190 - 220 mμ, während die Seitenketten von Tyrosin und Tryptophan bei 280 - 290 mμ Licht aufnehmen. Die Messung der Absorption ermöglicht die Bestimmung der Konzentration eines Proteins in einer Probe, wenn der Extinktionskoeffizient vorher ermittelt worden ist.

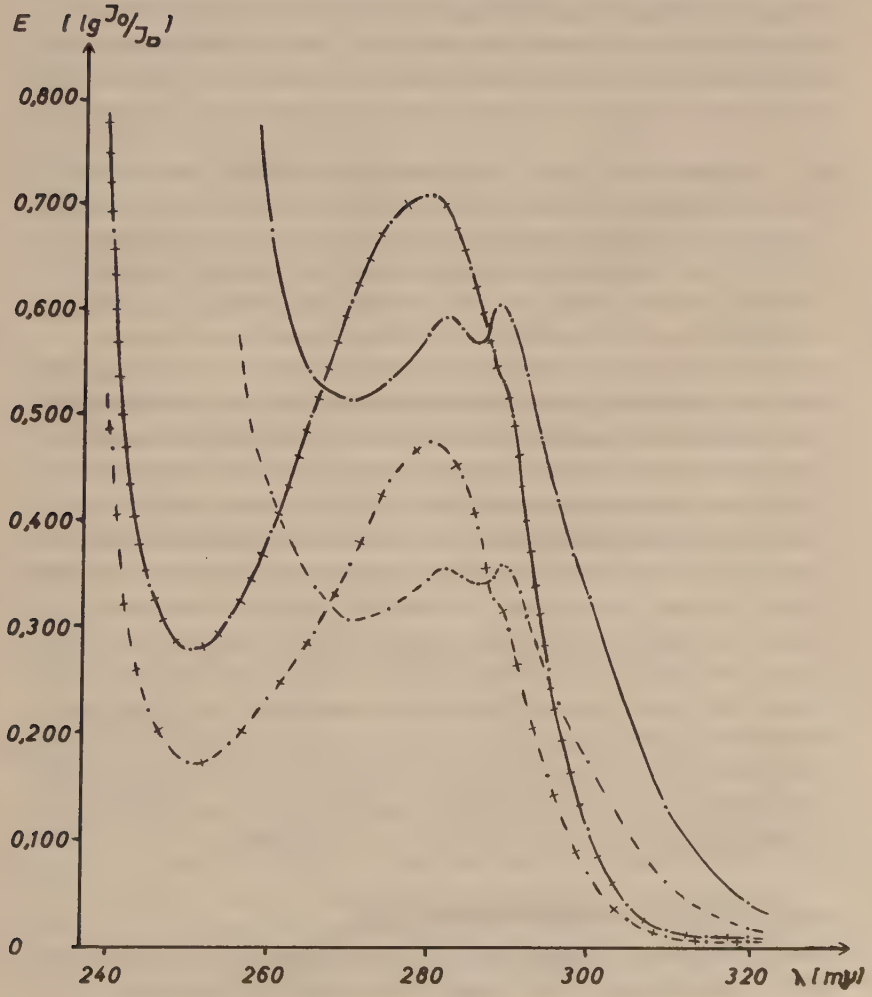
Die UV-Spektrogramme von Fibrinogen und Fibrin weisen qualitativ einen vollkommen gleichartigen und charakteristischen Verlauf der Kurve auf, da die Chromophoren des Fibrin Moleküls sich von denen des Fibrinogens nur durch das Fehlen von zwei Mol Tyrosin unterscheiden (Abb. 4, Seite 23). In stark alkalischer Lösung zeigen beide Proteine oberhalb von 245 mμ einen Doppelgipfel. Die zwei Absorptionsmaxima liegen bei 282 mμ (Trp) und bei 289 mμ (Tyr in der Phenolatform). Unterhalb pH 10 liegt Tyrosin in der undissoziierten Form vor, in der sein Absorptionsmaximum so verschoben ist, daß es mit dem des Tryptophans zusammenfällt (die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung des Trp- und Tyr-Gehaltes sind in Tabelle 2, Seite 26, angegeben).

d. Konzentrationsbestimmungen.

Gesicherte quantitative Analysen, insbesondere Zuckerbestimmungen, waren nur dann zu erhalten, wenn die genaue

Abbildung 4. UV-Spektren von Fibrinogen und Fibrin.

——— = Fgen in alkalischer Harnstofflösung,
+++++ = Fgen in neutraler Lösung,
– – – = Fin in alkalischer Harnstofflösung,
+ – + = Fin in neutraler Lösung.



Konzentration der Fibrinogenlösung bekannt war. Die UV-Spektroskopie ließ sich nur mittelbar für die Konzentrationsbestimmungen des Fibrinogens heranziehen. Denn zur Ermittlung des Extinktionskoeffizienten konnte von der Einwaage nicht ausgegangen werden, da Fibrinogen nicht quantitativ in Lösung ging bzw. während des Lösungsvorganges zu denaturieren und auszufallen begann. Auch der Proteinstickstoff der abzentrifugierten, überstehenden Lösung führte zu schwankenden Werten (47). Verursacht wurde der Fehler durch die Anwesenheit unterschiedlicher Mengen von freiem Glycin in den Präparaten nach dem Reinigungsprozeß.

Die Konzentration von Fibrinogen wurde durch Bestimmung des Stickstoffwertes von Fibrin ermittelt, nachdem Fibrinogen mit Thrombin zur Koagulation gebracht worden war. $Fibrin_s$ war besonders geeignet, da aus dessen Netzwerk alle Verunreinigungen durch Waschen mit Kochsalzlösungen ausgespült werden konnten. Die Bestimmung des Fibrin-Stickstoffs geschah nach der Mikromethode von Strauch (82). Bei der Berechnung des Fibrinogengehaltes der Ausgangslösung wurde die Koagulierbarkeit des Fibrinogens und der Peptidverlust bei der Koagulation von ca. 2% berücksichtigt. Die Koagulierbarkeit wurde durch Vergleich der Extinktionen von Fibrinogen und daraus hergestelltem Fibrin ermittelt, die nicht von der Anwesenheit von Glycin beeinflußt wurden. Verglichen wurden die Extinktionen der Fibrinogen Lösung, verdünnt mit einer alkalischen Harnstofflösung, mit der des Fibrins, gelöst in gleicher Harnstofflösung. Für eine Konzentrationsbestimmung mußten also drei aliquote Proben entnommen werden, von denen zwei mit Thrombin inkubiert wurden, eine für eine Stickstoffbestimmung des Gerinnsels und eine für einen Extinktionsvergleich des wiedergelösten Fibrins mit der dritten Probe.

e. Quantitative Aminosäureanalyse.

Von gereinigten Präparaten von Fibrinogen und Fibrin wurden Aminosäureanalysen angefertigt und mit Ergebnissen

anderer Autoren verglichen.
Die durch saure Hydrolyse freigesetzten Aminosäuren wurden an Ionenaustauschersäulen nach Moore und Stein (83) aufgetrennt, automatisch registriert und ihr Gehalt durch Vergleich mit einem Testlauf errechnet. Da Fibrinogen die stark säurelabilen Aminosäuren Tryptophan und Cystein enthält, mußten beide gesondert bestimmt werden. Tryptophan wurde zusammen mit Tyrosin nach der Methode von Bencze und Schmidt (84) photometrisch bestimmt und über Tyrosin eingerechnet. Cystein wurde durch Perameisensäureoxidation in Cysteinsäure übergeführt, die im sauren Hydrolysat bestimmt werden konnte. Andere empfindliche Aminosäuren, z.B. Methionin, wurden durch Zugabe von Merkaptoäthanol vor Veränderungen während der Hydrolyse geschützt. Hydrolyseverluste wurden nicht interpoliert. Ergebnisse siehe Tabelle 2, Seite 26.

Die Ergebnisse für Fibrinogen und Fibrin stehen in guter Übereinstimmung mit den zitierten Literaturangaben. Nur Threonin und Serin weichen stärker ab. Bei ihnen war die mittlere Abweichung vom Mittelwert vielleicht deshalb unverhältnismäßig hoch, weil sie bei dem vorgegebenen Puffersystem, das auf die Trennung von Kollagen Hydrolysaten eingestellt war, nicht gut aufgetrennt wurden.

II. S-sulfo-Derivate von Fibrinogen und Fibrin.

a. Präparation.

Wie in der Einleitung erwähnt, besteht Fibrinogen aus 6 Peptidketten, die durch Disulfidbindungen vernetzt sind. Selektive Spaltung dieser Bindungen sollte zur Freisetzung der Einzelketten führen. Eine schonende Methode, Disulfidbrücken mit Sulfit in Gegenwart von Kupfer zu spalten, wurde von Pechère beschrieben (85). Durch Einwirken von Sulfit entsteht zu einem Teil S-sulfo-Cystein. Die zum

Tabelle 2. Aminosäurezusammensetzung von Fibrinogen und Fibrin (Reste / 1000 Reste).

Protein	Fibrinogen			Fibrin	
Autor	Cartwright et al(86)	Henschen (87)	eigene Werte	eigene Werte	Henschen (87)
Asp	122,9	122,3	117,6	119,8	121,6
Thr	64,3	70,3	68,2	80,8	71,3
Ser	82,0	80,0	69,7	75,3	84,2
Glu	118,7	110,3	112,7	112,1	108,8
Pro	55,9	45,9	52,7	44,4	38,6
Gly	102,6	99,8	93,3	83,1	99,4
Ala	43,9	50,1	45,5	42,9	46,8
Cys/2	21,9	21,3	19,6	18,4	19,9
Val	41,6	46,4	57,3	53,7	50,3
Met	20,2	17,7	19,9	18,9	21,0
Ile	47,6	42,2	42,9	45,1	45,6
Leu	63,6	59,5	62,4	64,0	62,0
Tyr	34,7	37,0	37,4	37,2	35,1
Phe	31,5	29,7	33,5	33,2	30,4
His	20,7	18,3	20,7	23,3	22,2
Lys	74,7	70,0	66,7	72,1	71,4
Arg	53,2	53,3	54,7	52,5	50,3
Trp	-	25,9	25,2	23,2	21,1

anderen Teil entstandenen SH-Cystyl Reste werden im gleichen Arbeitsgang durch Kupferionen oxidativ mit Sulfit gekuppelt und dabei gleichfalls in S-sulfo-Gruppen übergeführt:

$$RSSR' + SO_3^{--} \longrightarrow RSSO_3^- + R'S^-$$

$$3R'S^- + SO_3^{--} + 2Cu^{++} \longrightarrow R'SSO_3^- + 2R'SCu$$

$$2R'SCu + 2SO_3^{--} + 4Cu^{++} \longrightarrow 2R'SSO_3^- + 6Cu^+$$

$$RSSR' + 2SO_3^{--} + 2Cu^{++} \longrightarrow RSSO_3^- + R'SSO_3^- + 2Cu^+$$

Clegg und Bailey (22) hatten das Verfahren erstmalig auf Fibrinogen angewandt. Mit Hilfe der Spaltung der Disulfidbrücken war ein entscheidender Schritt getan, um das komplizierte, mehrkettige Molekül in seiner Primärstruktur aufklären zu können. Die freigewordenen Proteinketten mußten vorher nur noch isoliert und identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sulfitolyse nach der von Henschen (24) abgewandelten Methode in 8 M Harnstoff durchgeführt (Natriumsulfit, Kupfersulfat, pH = 8 - 9). Ein geringfügiges Überschreiten von pH = 9,0, was nach Henschen vermieden werden mußte, erwies sich nicht als nachteilig. In Übereinstimmung damit stand die Tatsache, daß McKee et al. (27) die Sulfitolyse bei pH = 10,2 durchführten. Das Reaktionsprodukt wurde dialysiert, die Lösungen in Portionen aufgeteilt und eingefroren. Ein Lyophilisieren hatte sich nicht bewährt. Die sulfitolysierten Proteine waren im Gegensatz zum nicht gespaltenen Material in Wasser und Salzlösungen nur schwer löslich, was verwunderlich ist, da die negative Ladung und damit auch die Löslichkeit erhöht sein müßte.

b. Präparative Isolierung der Polypeptidketten.

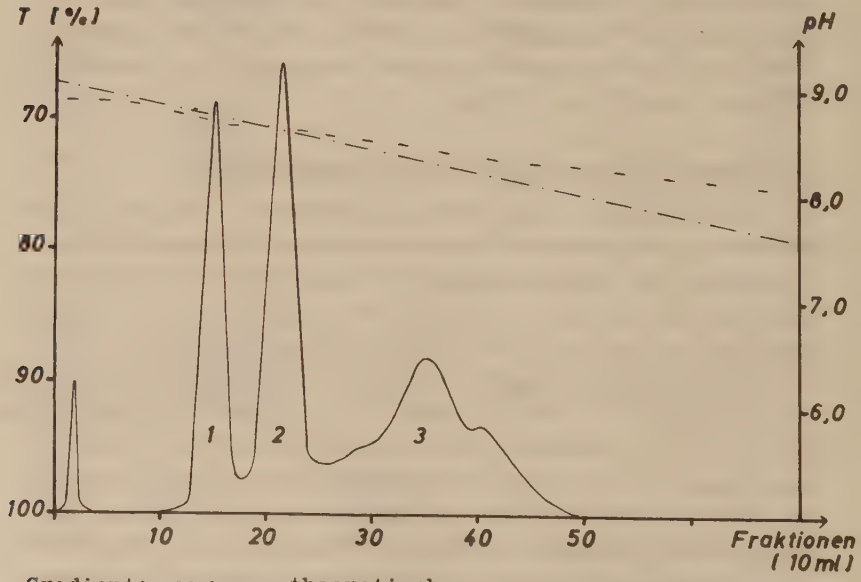
Zur Isolierung der einzelnen Peptidketten wurde das Sulfitolysat durch Ionenaustauscherchromatographie getrennt. Als Matrix zur Adsorption der Proteine und zur selektiven Freigabe an die mobile Phase wurde modifizierte Cellulose benutzt. Sie war entweder mit Carboximethyl-Gruppen (CM-Cellulose) oder mit Diäthylaminoäthyl-Gruppen substituiert (DEAE-Cellulose). Bei ersterer fand an den COO^- Gruppen ein Austausch von Kationen, bei der zweiten an NH_3^+ Gruppen einer von Anionen statt. Die Affinität der funktionellen Gruppen des Austauschers zum Protein war u.a. von pH und Ionenstärke abhängig: auch ein Abkömmling einer schwachen Säure wie Acetat konnte ein Protein von CM-Cellulose verdrängen, wenn es in einer genügend hohen Konzentration

vorlag (87). Durch geeignete Salzlösungen war es somit möglich, eine passende Affinität zwischen Protein und Säulenfüllung einzustellen.

α. Chromatographie an DEAE-Cellulose.

Henschen (25) hatte Trennungen von sulfitolysiertem Fibrinogen an DEAE-Sephadex unter Verwendung verschiedener Puffersysteme durchgeführt (Sephadex = künstliches Polysaccharid). Zu Vergleichszwecken wurde in der vorliegenden Arbeit mit DEAE-Cellulose begonnen. Der Puffer enthielt Harnstoff, für den Austausch erwies sich ein pH-Gradient als zweckmäßig (Abb. 5). Er wurde erzeugt, indem der Limitpuffer in dem Maße, in dem die Elution fortschritt, in ein Gefäß mit Startpuffer einfloß und dort mit diesem gemischt wurde.

Abbildung 5. Chromatographie von S-sulf-Fgen an DEAE-Cellulose.



Gradient: —·— = theoretisch, - - - = gemessen,
Laufbedingungen siehe nächste Seite.

Laufbedingungen zu Abb. 5, auf Seite 28:

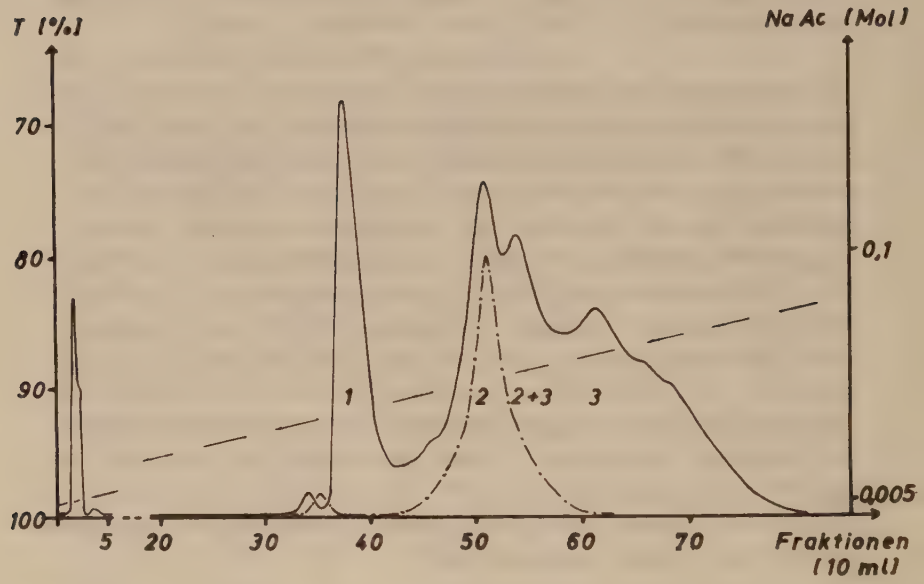
Puffer: 8 M Harnstoff in 0,3 M Tris. Elution: 500 ml Startpuffer pH = 9,2 zu 500 ml Limitpuffer pH = 6,9. Elutionsgeschwindigkeit = 80 ml / Std. Fraktion = 10 ml.

Die erste der drei registrierten Fraktionen entsprach der α(A)-Kette, die zweite der ß(B)-Kette und die isolierte dritte der γ-Kette (Identifizierung durch Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren siehe Seite 34). Die letztere Fraktion war auffallend stark auseinandergezogen, was in geringerem Umfange für später austretende Anteile normal ist. Das Arbeiten an DEAE-Cellulose war aber mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Infolge pH Erniedrigung trat eine Schrumpfung der Cellulose ein. Die Säulenfüllung zog sich von der Puffereintrittsstelle zurück und es entstand ein Hohlraum, der wie ein zweites Puffermischgefäß wirkte. Der Gradient wurde daher etwas abgeflacht (konkav) und das End-pH nicht ganz erreicht. Um die beschriebenen Schwierigkeiten zu umgehen, wurde zum Gebrauch der weniger empfindlichen CM-Cellulose übergegangen.

ß. Chromatographie an CM-Cellulose.

Zugrunde lag ein Puffersystem von Clegg und Bailey (22). Jetzt lag das für eine Elution günstige pH auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes der ß(B)- und α(A)-Ketten. Die drei Fraktionen traten in umgekehrter Reihenfolge aus der Säule aus. Die erzielte bessere Auflösung zeigte einige Verunreinigungen bzw. Artefakte oder Heterogenitäten an: die γ-Fraktion (Peak 1) wies häufig einen kleinen Vorläufer auf, die ß(B)-Fraktion (Peak 2) erschien als deutlicher Doppelgipfel und die α(A)-Fraktion (Peak 3) zeigte Andeutungen von Schultern im terminalen Abschnitt (siehe Abb. 6, Seite 30).

Abbildung 6. Chromatographie von S-sulf-Fibrinogen an CM-Cellulose.



——— = S-s-Fgen, -·-·- = ß(B), Rechromatographie,
- - - = Puffergradient.

Laufbedingungen:

Puffer: Na-Acetat 8 M an Harnstoff, pH = 5,3
Elution: 500 ml Startpuffer, 0,005 M NaAc zu 500 ml Limitpuffer, 0,1 M NaAc, Gradient linear, 100 ml / Stunde, Fraktionen à 10 ml.

Von den in der Literatur diskutierten Heterogenitäten konnten die der γ-Kette chromatographisch nicht nachgewiesen werden. In der ß(B)-Fraktion erwies sich die zweite Schulter als stark mit α(A)-Anteilen verunreinigt (zur Identifizierung der Einzelketten durch Elektrophorese in Polyacrylamidgelen siehe Seite 43). Die α(A)-Fraktion wurde also offensichtlich in zwei verschiedene Anteile aufgetrennt. Der deutliche Anfangsgipfel (Gläschen 2 und 3) enthielt nur

eine minimale Menge gefärbter Substanzen, die relativ stark im UV-Licht absorbierten. Deren Gewichtsanteil am Gesamtprotein lagen aber unter ein Prozent. Ca. 85% des gesamten aufgetragenen Proteins wurden eluiert.

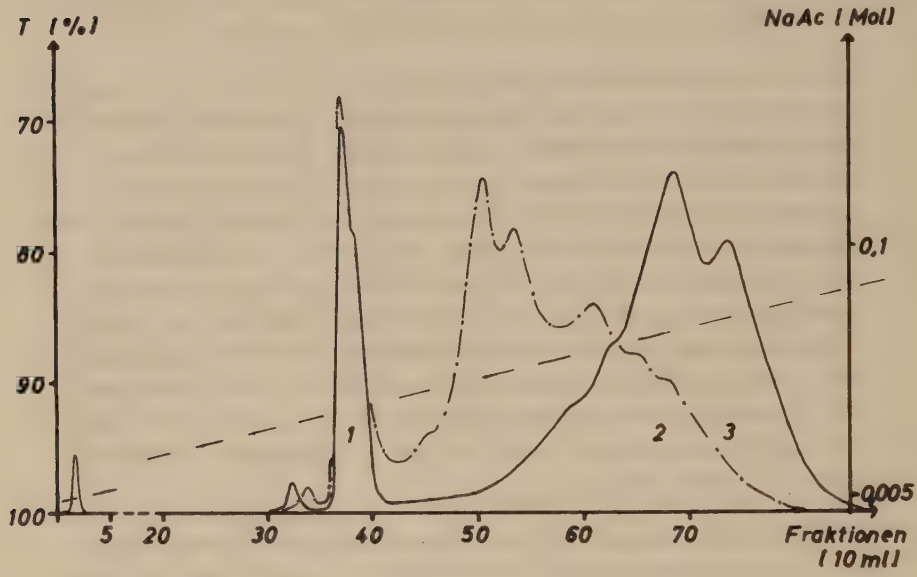
Zur Weiterverarbeitung wurden nur die Fraktionen aus den zentralen Bereichen der Elutionsmaxima gesammelt. Ergaben Tests trotzdem eine Verunreinigung der Proben durch die Nachbarfraktionen, wurde unter gleichen Elutionsbedingungen rechromatographiert, nachdem die Chargen durch Ultrafiltration eingeengt und gegen Startpuffer umdialysiert waren. In der Regel war dieses Verfahren nur bei der 2. Fraktion nötig, da ansonsten beim Verwerfen des mit α(A) verunreinigten Anteils zuviel Substanz verloren gegangen wäre. Bei einer Rechromatographie ging der ß(B)-Fraktion ein kleiner Vorpeak voraus. Er wurde, verglichen mit dem ersten Chromatogramm, kurz vor der γ-Komponente eluiert (Abb. 6, Seite 30).

Bei der Auftrennung von S-sulfo-Fibrin blieb, verglichen mit S-sulfo-Fibrinogen, die γ-Kette in ihrer Lage im Chromatogramm unverändert. Die α- und ß-Ketten hatten nach Verlust der stark sauren Fibrinopeptide einen höheren Isoelektrischen Punkt und wurden entsprechend später eluiert (Abb. 7, Seite 32).

Wider Erwarten gestaltete sich die Auftrennung der α- und ß-Ketten von S-sulfo-Fibrin schwierig. Das Arbeiten mit konkavem Gradienten oder mit höherem pH brachte keine Besserung der Ergebnisse. Eine Reinigung wurde nur durch Rechromatographie der stark geschnittenen Fraktionen erzielt.

Die chromatographischen Trennungen standen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Clegg und Bailey (22) und von Henschen (25).

Abbildung 7. Chromatographie von S-sulf-Fibrin an CM-Cellulose. Vergleich mit S-sulf-Fibrinogen.



——— = S-s-Fin, -·-·- = S-s-Fgen, - - - = Gradient.
Laufbedingungen wie bei Abb. 6, Seite 30.

c. Analytische Untersuchungen der getrennten Fraktionen von S-sulf-Fibrinogen.

α. N-terminale Aminosäuren.

Zur Charakterisierung der an CM-Cellulose getrennten Fraktionen wurden ihre Aminoendgruppen bestimmt. Bei diesen Analysen wurden anfangs zwei verschiedene Methoden verwendet, um eine größere Sicherheit bei der Identifikation der N-terminalen Aminosäuren zu erreichen.

Bei der Dinitrofluorbenzol- (DNP)-Methode von Sanger (89)

wird die N-terminale Aminosäure mit 2,4-Dinitrofluorobenzol markiert. Die Dinitrophenyl-(DNP)-Aminosäuren sind hydrolysebeständig. Sie lassen sich aus dem sauren Hydrolysat isolieren und an ihrer charakteristischen, meist gelben Färbung auf einem Dünnschichtchromatogramm identifizieren.

Bei der Phenylisothiocyanat-(PITC)-Methode von Edman (90) reagiert zunächst PITC mit der N-terminalen Aminosäure. Im sauren Milieu erfolgt dann ein Ringschluß und die N-terminale Aminosäure wird als Phenylthiohydantoin-(PTH)-Aminosäure vom Protein abgespalten. Unter günstigen Versuchsbedingungen lassen sich eine Anzahl weiterer Aminosäuren nacheinander vom N-terminalen Ende her abbauen, so daß eine Sequenzbestimmung durch schrittweisen Abbau möglich wird (Edman Abbau).

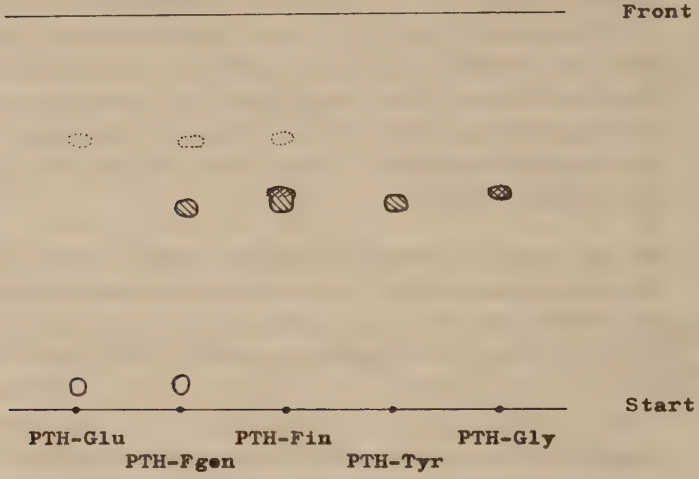
Auf die zuletzt genannte Methode wurde später ausschließlich zurückgegriffen, da die untere Nachweisgrenze für PTH-Aminosäuren wesentlich niedriger lag. Zudem war die Lichtempfindlichkeit der DNP-Aminosäuren größer und ihre Ausbeute teilweise schlecht. Die Abspaltung der PTH-Aminosäuren wurde an Proteinproben vorgenommen, die auf Papierstreifen aufgetragen waren (Mikromethode nach Schroeder, 91). Die abgetrennten PTH-Aminosäuren wurden an Dünnschichtplatten, beschichtet mit Kieselgel und Fluoreszenzindikator, aufgetrennt. Im UV-Licht waren sie als dunkle Flecken zu erkennen. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus Chloroform und Methanol (92). Die R_F-Werte unterschieden sich etwas von den bei Pataki (93) und auch bei Stahl (92) angegebenen und wurden neu bestimmt (Tab. 3).

Tabelle 3. R_F-Werte einiger PTH-Aminosäuren.

Autor	PTH-Glu	PTH-Gly	PTH-Ser	PTH-Thr	PTH-Tyr
Stahl (92)	0,04	0,56	-	0,45	0,47
Pataki (93)	0,05	0,68	0,43	0,58	0,59
eigene Werte	0,05	0,55	0,40	0,49	0,52

Als Ergebnis des in Abb. 8 dargestellten Laufes waren Tyrosin und Glutaminsäure als Endgruppen von Fibrinogen anzusehen und Tyrosin und Glycin als die von Fibrin.

Abbildung 8. Typisches Dünnschichtchromatogramm der PTH-Aminosäuren von Fibrinogen und Fibrin nebst Referenzsubstanzen.



Laufbedingungen:

stationäre Phase : Kieselgel mit Fluoreszensindikator,
mobile Phase : Chloroform / Methanol (9:1),
Laustrecke : 9 cm,

Identifikation im UV-Licht, außerdem Tyr: gelb, Gly: rot, unter Ammoniakeinwirkung.

Gleichartige Versuche an chromatographisch getrennten Fraktionen von Fibrinogen ergaben eine Zuordnung von endständigem Tyrosin zur γ-Kette sowie von endständiger Glutaminsäure zur α(A)-Kette. Die ß(B)-Kette ergab keine freie Aminoendgruppe. Die N-terminale Pyrrolidonkarbonsäure der ß(B)-Kette war mit dieser Methode nicht nachweisbar, da sie wegen Fehlens einer freien Amino-Gruppe kein PTH-Derivat bilden

kann.

Im Chromatogramm trat außerdem eine Fraktion mit dem R_F = 68 auf. Diese wurde auch bei gekaufter, chromatographisch reiner Glutaminsäure gefunden. Es konnte sich bei ihr offensichtlich nur um ein Zersetzungsprodukt handeln. Sie wurde deswegen nicht in die weitere Betrachtung einbezogen.

ß.Zuckerbestimmungen.

In Fibrinogen, Fibrin und den getrennten Fraktionen von S-sulfo-Fibrinogen wurden Hexosen und Glucosamin bestimmt. Die Verteilung dieser Kohlenhydrate über die einzelnen Peptidketten von Fibrinogen war bisher nicht bekannt. Die Hexosen wurden nach Umsetzung mit Anthron photometrisch bestimmt (94). Die Gegenwart von Tryptophan stört diese Bestimmung, indem mit zunehmenden Trp-Gehalt der Absorptionswert beim Meßpunkt 625 mμ immer mehr absinkt und bei 525 mμ ein neues, immer größeres Absorptionsmaximum entsteht. Dazwischen liegt aber bei 585 mμ ein Punkt, bei dem der Trp-Gehalt ohne Auswirkung auf die Hexosenextinktion bleibt (47). Gemessen wurde demnach bei 585 mμ gegen 720 mμ als Nullwert. Glucosamin wurde im Wege der automatisierten Farbentwicklung und Extinktionsmessung nach der Methode von Balazc et al. (95) bestimmt*(Tab. 4).

Tabelle 4. Zuckergehalte von Fibrinogen und seinen Derivaten.

Protein	Hexosen (%)	Glucosamin (%)
Fibrinogen	1,56	0,58
Fibrin	1,57	0,59
S-sulf-Fgen, α(A)	0,79	0,52
" , ß(B)	0,69**	0,57**
" , γ	3,23	0,62

**gemessen wurde ein Gemisch aus α(A)- und ß(B)-Ketten.

* Herrn Dr. Bräumer sei an dieser Stelle recht herzlich für die Ausführung dieser Glucosaminbestimmungen gedankt.

Mit diesen Messungen wurden die Hexosenbestimmungen bei Fibrinogen und Fibrin von Gollwitzer (47) voll bestätigt. Die von verschiedenen anderen Autoren angegebenen, stark variierenden Werte finden zu einem Teil ihre Ursache in den oben erwähnten methodischen Fehlerquellen.

Auch die von Mester et al. (48) festgestellten Heterogenitäten der Hexosenverteilung innerhalb des Moleküls wurde mit einigen Abweichungen insofern gefunden, als die γ-Kette sogar doppelt soviel Hexosen wie α(A)- und ß(B)-Ketten zusammen enthält. In weit geringerem Ausmaß sind ähnliche Unterschiede im Vorkommen des Aminozuckers angetroffen worden. Beim Übergang von Fibrinogen zu Fibrin verändern sich Hexosen- und Glucosamingehalt nicht.

III. Elektrophorese an Polyacrylamidgel.

a. Allgemeines.

Für eine schnelle Analyse von Fibrinogen und seiner Spaltprodukte erschien von den vor meinen Untersuchungen angewandten Methoden die Papierelektrophorese (24) günstiger als die Stärkegel Elektrophorese zu sein. Mit der zweiten Methode erhielten Clegg und Bailey (22) von Sulfit gespaltenem Fibrinogen und Fibrin bei pH = 3,5 nur zwei Banden; die α(A)- und ß(B)- bzw. die α- und ß-Ketten blieben ungetrennt. Nur die γ-Kette wanderte unterschiedlich. Reptilase behandeltes Fibrinogen (R-Fibrin), bei dem nur das A-Peptid abgespalten war, trennte sich dagegen in drei Banden auf, weil nach dem Verlust von negativ geladenem A-Peptid der Ladungsunterschied der α- zur unveränderten ß(B)-Kette größer geworden ist. Die α-Kette wanderte sichtbar langsamer als die ß(B)-Kette in Richtung zum positiven Pol.

Eigene Versuche mit der Papierelektrophorese führten nicht zu befriedigenden Ergebnissen. Bei der Auftrennung von sulfitolysiertem Fibrinogen erhielt man zwar drei Banden,

jedoch waren diese breit und oft ungleichmäßig, was eine quantitative Auswertung erschweren würde. Häufig erschienen sie mehr oder weniger verwischt, weil Adsorptionseffekte am Trägermaterial nicht auszuschließen waren. In geringer Menge vorliegende Proteinanteile können leicht übersehen werden. Wegen der geringen elektrophoretischen Beweglichkeit von Fibrinogen und seinen Derivaten dauerten allein die Trennungen ca. 20 Stunden. Henschen hatte bereits festgestellt, daß das Alter der Pufferlösungen die Wanderungsgeschwindigkeit und die Trennqualität der Proteinfraktionen beeinflußt. Schwierigkeiten mit der Reproduzierbarkeit, unbefriedigende Auflösung und überlange Versuchsdauer ließen die Anwendung einer anderen Methode, der Elektrophorese an Polyacrylamidgel, günstiger erscheinen.

b. Besonderheiten der Elektrophorese an Polyacrylamidgel.

Nach der erstmaligen Beschreibung dieser Methode durch Ornstein und Davis (96) hat sie schnell Bedeutung in der Analytischen Chemie der Makromoleküle erlangt. Sie wird z.B. angewandt zur Reinheitsprüfung, zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen, zur schonenden Konzentration von Proteinlösungen u.a.m. Neuerdings wurden präparative Trennungen (97) und Molekulargewichtsbestimmungen (98) beschrieben.

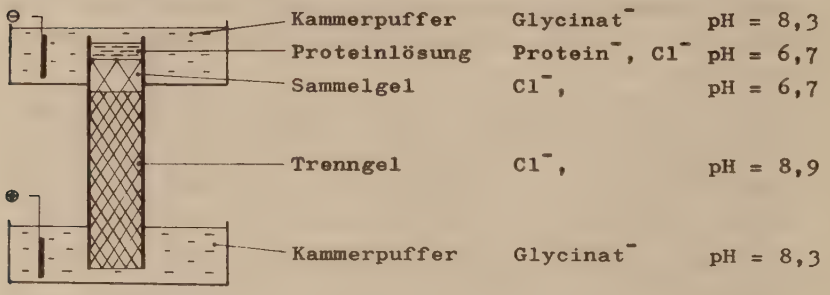
Proteine sind Polyelektrolyte und tragen abhängig vom pH eine bestimmte Gesamtladung, die ihnen in einem angelegten elektrischen Feld eine bestimmte Bewegung verleiht. Diesem elektrophoretischem Effekt überlagern sich noch zusätzliche Einflüsse, die bei der Gelelektrophorese besser übersehen werden können als bei der Papierelektrophorese:

1. Das Gel besteht aus fadenförmigen Polymeren (Monomer = Acrylamid), die durch Vernetzer (z.B. N -N'-Methylbisacrylamid) seitlich verknüpft sind. In Abhängigkeit von der Moleküllänge zwischen zwei Vernetzungsstellen und der Konzentration des Acrylamids entsteht ein dreidimensionales

Netzwerk bestimmter Porenweite. Beim Durchwandern des Gels werden größere Moleküle stärker behindert als kleinere, es findet eine selektive Trennung nach Größe (Molekulargewicht) und Gestalt (Tertiärstruktur) statt = Molekülsiebeffekt. Somit gilt eine Einschränkung für die Anwendbarkeit der Gel-Elektrophorese. Proteingemische, deren Komponenten sich erheblich im Molekulargewicht voneinander unterscheiden, können u.U. nicht befriedigend in einem Gel untersucht werden, nämlich dann nicht, wenn die niedrigermolekularen Fraktionen das Gel durchwandert haben, ohne daß die großen Moleküle hinreichend in das Gel eingedrungen sind.

2. Ein besonderes Merkmal in der Anwendungsform der Disk-Elektrophorese sind Diskontinuitäten von pH und Porengröße. An der Grenzfläche zwischen grobporigem Obergel (Sammelgel) im Trennmedium und einem feinporigen Trenngel wird die aufgetragene Probe in einer scheibchenförmigen Zone stark konzentriert (Konzentrierungseffekt), siehe Abb. 9.

Abbildung 9. Schematischer Aufbau einer Disk-Elektrophorese (nach Maurer, 99).



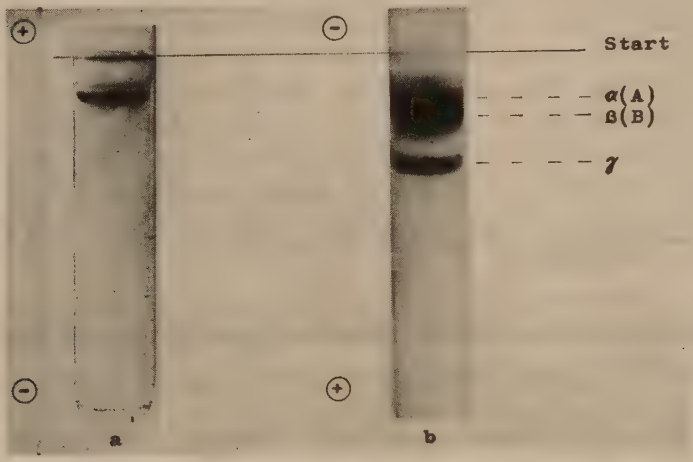
Ein zusätzlich schärfender Effekt auf die Banden wird dadurch erreicht, daß als Kammerpuffer Glycinatlösungen von pH = 8,3, im Trenngel dagegen Chlorid haltige Puffer von pH = 6,7 verwendet werden. Bei pH = 6,7 bewegen sich

Cl-Ionen am schnellsten. In Substanzlösung und Sammelgel entsteht daher eine Zone geringer Leitfähigkeit bzw. hoher Feldstärke. Die gering dissoziierten Proteinanteile wandern mit hoher Geschwindigkeit aber verschieden rasch hinter den Cl-Ionen und konzentrieren sich an der Grenzfläche zum Trenngel. Mit Überschreiten der pH-Diskontinuität zum Trenngel wird die Beweglichkeit der Glycinat-Ionen ähnlich groß wie die der Cl-Ionen. Sie überholen die Proteine. Diese befinden sich jetzt in einem homogenen elektrischen Feld und wandern je nach - jetzt höherem - Dissoziationsgrad (pH!) verschieden schnell.

c. Elektrophorese von Fibrinogen und seiner S-sulf-Derivate.

Karges (16) hatte Fibrinogen und tryptische Abbauprodukte in einem Puffersystem nach Reisfeld et al. (100) im sauren pH-Bereich (pH = 4,5) analysiert. In eigenen Versuchen wurde Sulfit gespaltenes Fibrinogen im selben System untersucht. Zur Verbesserung der Löslichkeit der Proteinfraktionen wurde dem Trennpuffer 6 M Harnstoff zugesetzt; eine Maßnahme, die bei Arbeiten an Ionenaustauschern die Auftrennung wesentlich verbessert hatte. Es konnte jedoch keine vollkommene Auftrennung der drei Proteinketten beobachtet werden, obwohl dies auf Grund der verschiedenen elektrophoretischen Beweglichkeit der Einzelfraktionen zu erwarten gewesen wäre (siehe 23) und obwohl eine Trennung durch Ionenaustausch-Chromatographie im sauren Milieu erfolgreich war. Durch ein höheres Molekulargewicht der α(A)-Kette wird anscheinend ihre höhere elektrophoretische Mobilität bei saurem pH infolge des Molekülsiebeffektes kompensiert. Um beide Effekte gleichsinnig wirken zu lassen, wurden die weiteren Versuche im alkalischen Milieu durchgeführt. In dieser Anordnung gelang es erstmalig, die drei Einzelketten von sulfitgespaltenem Fibrinogen in der Disk-Elektrophorese aufzutrennen (Abb. 10b, Seite 40, siehe auch Hörmann et al. 101). In der Regel wurde ein Kammerpuffer von

Abbildung 10. Disk-Elektrophorese von sulfitgespaltenem Fibrinogen bei verschiedenen pH-Werten.



Gel: 6 M an Harnstoff, Konzentration = 4%,
wirksames pH: a. = 4,5, b. = 9,2,
Laufzeit: a. = 3 Std., b. = 4 Std.

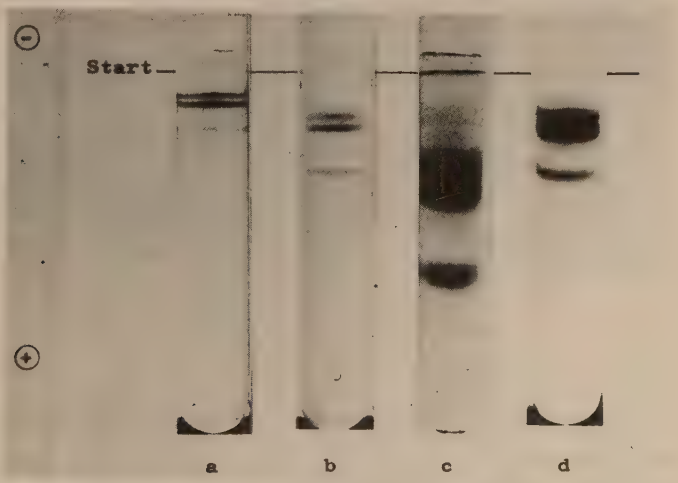
pH = 8,4 gewählt. In diesem Fall betrug das effektive pH = 9,2. Die Proteine wanderten anodisch.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine hängt u.a. von der Gelkonzentration ab. In Abb. 10, Seite 41, sind Trennungen von sulfitolysiertem Fibrinogen in Gelen verschiedener Konzentration wiedergegeben. Man erkennt deutlich, daß bei verdünnteren Gelen die Fraktionen weiter einwandern. Gleichzeitig werden die Banden unschärfer.

Eine deutliche Trennung wurde für S-sulf-Fibrinogen bei einem 10%igem Gel beobachtet. Die Banden waren sehr scharf, wanderten aber nur wenig in das Gel ein. Im 4%igem Gel wanderten die Proteine wesentlich schneller. Weil in einem gröberporigen Gel die Diffusion größer ist, waren die Banden jedoch stärker verbreitert, was den Vorteil der

größeren Wanderungsstrecke wieder aufhob (Abb. 11c, d). Im 7,5%igem Gel wurde die beste Auftrennung erzielt. Die Banden waren zwar nicht so scharf wie beim 10%igen, dafür ließen sich aber feinere Inhomogenitäten einer Fraktion erkennen. Eine Laufzeit von vier Stunden wurde als genügend angesehen (Abb. 11b). Eine Verlängerung der Laufzeit bewirkte zwar, daß sich die Bandenmittelpunkte weiter voneinander spreizten, jedoch nahm wiederum auch die Bandenbreite infolge länger andauernder Diffusion zu.

Abbildung 11. Disk-Elektrophorese von S-sulf-Fibrinogen unter verschiedenen Versuchsbedingungen.



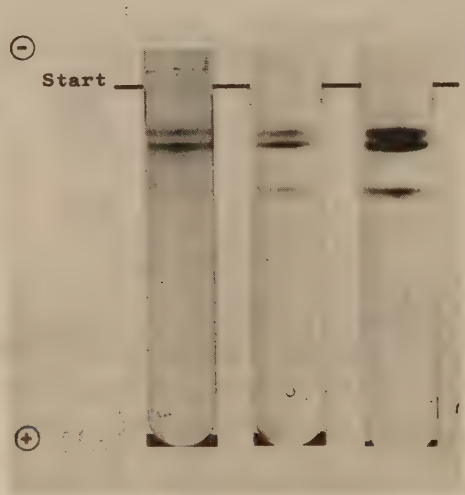
	a	b	c	d
Gelkonzentration:	10%	7,5%	4,0%	4,0%
Laufzeit:	4 Std.	4 Std.	4 Std.	2 Std.

alle Gele enthielten 6 M Harnstoff, wirksames pH = 9,2.

Die aufgetragene Proteinmenge war nicht ausschlaggebend für die Wanderungsgeschwindigkeit, sofern man unterhalb der maximalen Trennkapazität des Gels blieb. Es wurden im allgemeinen 50 - 100 µg Protein aufgetragen - die Menge wurde je nach verfolgtem Ziel variiert. Bei Reinheitsprüfungen

wurde mehr aufgetragen, um spurenhafte Verunreinigungen zu entdecken. Relativ geringe Proteinmengen ergaben eine bessere Auflösung infolge schmalerer Banden (Abb. 12). Wichtig ist, daß die Flüssigkeitsmenge der aufgetragenen Proteinproben untereinander gleich sind, damit in jedem Röhrchen annähernd der gleiche elektrische Widerstand herrscht. Trotz genauen Arbeitens kam es vor, daß die Wanderungsstrecken gleicher Proben bei verschiedenen Läufen etwas variierten. Deshalb wurden bei jedem Lauf Vergleichsproben mit aufgetragen.

Abbildung 12. Disk-Elektrophorese von S-sulf-Fibrinogen in verschiedenen Proteinkonzentrationen.



Proteingehalt : 30γ 50γ 100γ

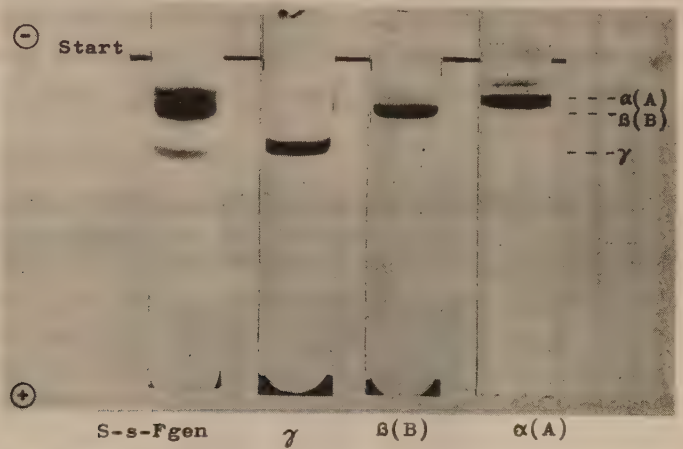
Gele : Konzentration = 7,5%, 6 M Harnstoff,
Laufzeit : 4 Stunden, wirksames pH = 9,2.

d. Disk-Elektrophorese der chromatographisch isolierten S-sulf-Derivate von Fibrinogen.

Die Zuordnung der drei Banden zu den drei Proteinketten

erfolgte, indem die Wanderung chromatographisch aufgetrennter Einzelfraktionen in der Disk-Elektrophorese mit den Fraktionnen eines Gesamtsulfitolysates von Fibrinogen verglichen wurde (Abb. 13).

Abbildung 13. Disk-Elektrophorese von Fibrinogen und seiner getrennten Polypeptidketten.



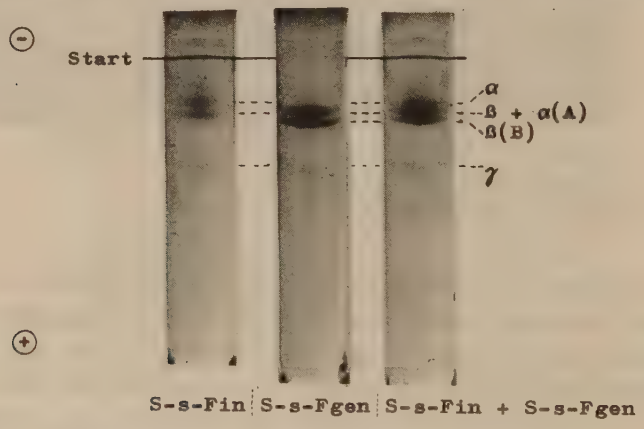
Gele: 6 M Harnstoff, Konzentration = 7,5%,
wirksames pH = 9,2, Laufzeit = 4 Stunden.

Die am stärksten anodisch wandernde Bande entsprach der γ-Kette, die nächste der ß(B)-Kette und die langsamste der α(A)-Kette. Diese Reihenfolge war nach den Werten für die isoelektrischen Punkte zu erwarten. Nach Henschen (24) liegt pI für die γ-Kette bei pH = 5,0, für ß(B) bei 5,3 und für α(A) bei 6,1. Die α(A)-Kette war im alkalischen Milieu am wenigsten geladen und wanderte folglich am lansamsten zur Anode. Die Banden, die mit Amidoschwarz - B angefärbt waren, zeigten auffallende Unterschiede in der Farbintensität; am stärksten war die ß(B)-Bande, am schwächsten die γ-Bande gefärbt. Die Ursache hierfür waren nicht unterschiedliche

Konzentrationen - alle drei Ketten lagen im nichtfraktionierten Protein in äquimolaren Mengen vor - sondern im verschiedenen Gehalt an polaren Aminosäuren, an die der Farbstoff sich anlagert. Die γ-Bande war uneinheitlich; sie wies eine schwach gefärbte Vorbande auf. Im Gegensatz zum Verhalten bei Chromatographie an CM-Cellulose war die α(A)-Bande einheitlich. Lediglich Spuren von wesentlich langsamer wandernden Anteilen waren stets vorhanden. Wegen der großen Unterschiede, die diese Fraktionen in Ladung oder Molekulargewicht haben mußten, wurden sie nicht als Heterogenitäten der α(A)-Kette angesehen, sondern als Artefakte oder Polmere.

e. Disk-Elektrophorese von sulfitolysiertem Fibrin.

Abbildung 14. Disk-Elektrophorese von S-sulf-Fibrin.



Gele: 6 M Harnstoff, Konzentration = 7,5%,
wirksames pH = 9,2, Laufzeit = 4 Stunden.

In Abb. 14 sind elktrophoretische Trennungen von sulfitolysiertem Fibrinogen und Fibrin miteinander verglichen. Erwartungsgemäß trat bei der γ-Bande von S-sulf-Fibrin keine Änderung im Laufverhalten auf. Die bereits oben beschriebene

Heterogenität wurde wieder festgestellt. Die ß- und α-Ketten wurden im Gegensatz zur Chromatographie an CM-Cellulose gut aufgetrennt und wanderten deutlich langsamer anodisch als die ß(B)- und α(A)-Ketten. Der isoelektrische Punkt lag für ß bei pH = 5,6, für α bei pH = 6,9 (24). Ein Gemisch aus S-sulf-Fibrinogen und S-sulf-Fibrin ergab nur vier Banden, da die ß-Kette etwa gleich wie die α(A)-Kette wanderte und somit nur die γ-, die ß(B)- und α-Ketten isoliert auftraten.

IV. Mit Kupferäthylendiamin behandeltes Fibrinogen.

a. Vorbemerkungen.

Schauenstein und seine Mitarbeiter (75) hatten Fibrin mit Kupferäthylendiamin bei alkalischem pH gespalten und dabei zwei Fraktionen erhalten. Eine in NaCl-Lösung unlösliche Fraktion-I, etwa 75% des Gesamtproteins und eine lösliche, instabile Komponente (Fraktion-II), ca. 15% des Ausgangsmaterials. Bemerkenswert ist nach Deutung spektrokopischer Befunde, daß die zwei Fraktionen auffallende Unterschiede im Gehalt einiger Aminosäuren - Tyrosin und Arginin - aufzuweisen schienen. Das größere Fragment-I soll das gesamte Tyrosin enthalten. Diese Aminosäure spielt durch Ausbildung von Nebenvalenzen über die phenolische Hydroxylgruppe zur Karboxylgruppe saurer Aminosäuren eine Rolle bei der Stabilisierung der Tertiärstruktur und bei der Aggregation der Fibrin-Moleküle zu Fibrin-Fibrillen.

Schauenstein und seine Mitarbeiter hatten seinerzeit angenommen, daß ein kleines Absorptionsmaximum im Spektrum der Fraktion-II bei 338 mμ, das bei Fraktion-I fehlt, dem Arginin zukommt. Demnach sollte Fraktion-I allenfalls Spuren von Arginin besitzen.

Von den obigen Autoren wurde Fibrin mit Kupferäthylendiamin gespalten und die erhaltenen Produkte untersucht. Davon abweichend wurde in dieser Arbeit von Fibrinogen ausgegangen.

Zwar ist hochgereinigtes Fibrinogen wesentlich umständlicher herzustellen als qualitativ gleichwertiges Fibrin. Letzteres braucht nur als synärisiertes Gerinnsel, das aus I_o-Fibrinogen gewonnen wurde, gut ausgewaschen zu werden. Für die Versuche mit Fibrinogen sprach aber die Erwartung, daß Molekülfragmente der Polypeptidketten von Fibrinogen besser als die von Fibrin zu identifizieren seien, da die verschiedenen Ketten des Fibrinogens unterschiedliche N-terminale Aminosäuren tragen.

b. Präparation.

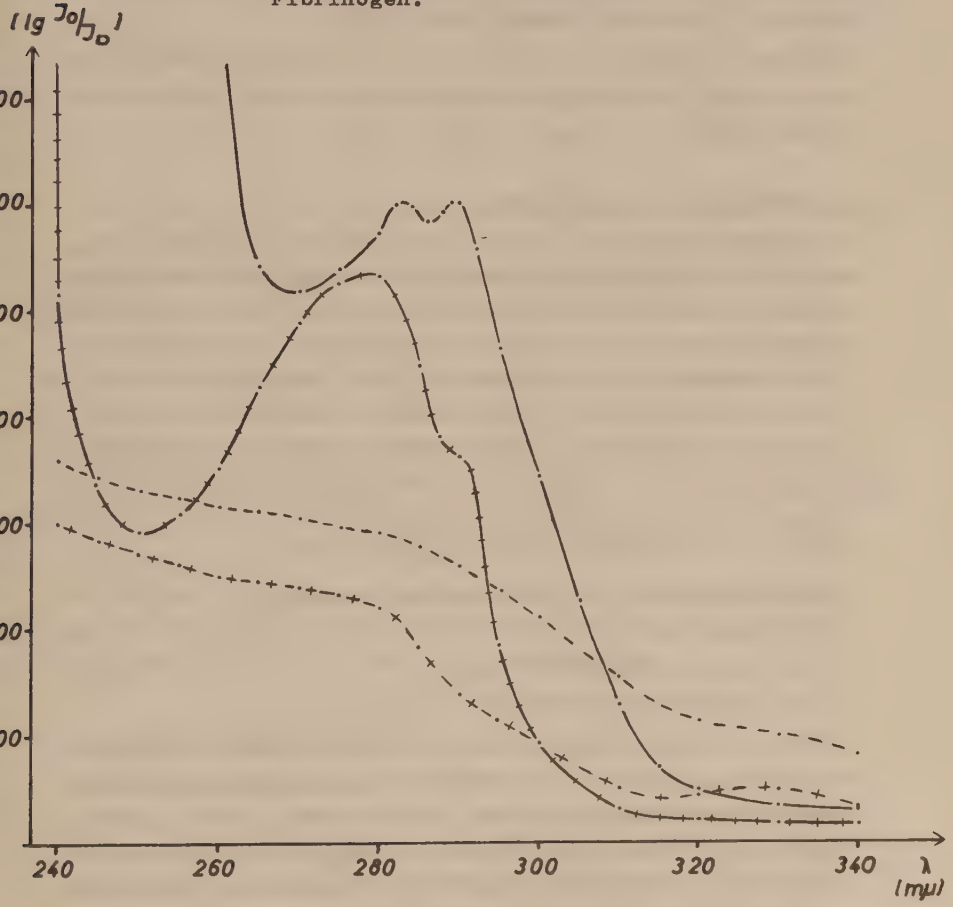
Entsprechend den Vorschriften Schauensteins (75) wurde lyophilisiertes Fibrinogen in einer 16%igen Lösung von Kupferäthylendiamin (CuÄDA) aufgelöst. Bei Verwendung von Fibrinogenlösungen wurden diese mit konzentrierteren CuÄDA-Lösungen versetzt, sodaß immer das gleiche Gewichtsverhältnis von Fibrinogen zum Spaltungsreagens eingehalten wurde. Nach vier Stunden wurde mit verdünnter Essigsäure neutralisiert und gegen eine NaCl-Lösung dialysiert. Der flockige Niederschlag der inhomogen gewordenen Lösung wurde abzentrifugiert, mit NaCl-Lösung und dann mit Aqua bidest. mehrmals gewaschen und lyophilisiert. Diese Fraktion wurde Schauenstein folgend als Fraktion-I bezeichnet (Cu-I-Fgen). Der Proteinanteil im Überstand, Fraktion-II (Cu-II-Fgen), wurde gegen Aqua bidest. dialysiert und ebenfalls gefriergetrocknet.

c. UV-Spektroskopie.

Charakteristisch für den Verlauf des Spektrums von Cu-I-Fibrinogen war der Doppelgipfel bei 282 mμ und 289 mμ in alkalischer Lösung; damit ist sein Kurvenbild dem Spektrum des Fibrinogens identisch (Abb. 15, Seite 47). Nach der Methode von Benoze und Schmidt (84) wurden der Tyrosin und Tryptophan Gehalt bestimmt (siehe Seite 54). Das molare Verhältnis von Tyrosin zu Tryptophan war 1,4 bei

Cu-I-Fibrinogen, 1,5 bei Fibrinogen. Damit ist Cu-I-Fibrinogen relativ ärmer an Tyrosin als Fibrinogen.

Abbildung 15. Spektrogramm der CuÄDA-Derivate von Fibrinogen.



Cu-I-Fibrinogen : ——— = alkalisch*, +++++ = neutral,
Cu-II-Fibrinogen: – – – = alkalisch*, + – + = neutral,
* = 40 % Harnstoff in 0,2 N Natronlauge.

Cu-II-Fibrinogen wies dagegen nur ein schwach ausgeprägtes Maximum bei 282 mμ auf. Ein Tyrosin Gehalt ist spektrophotometrisch nicht sicher nachweisbar, Tryptophan scheint in relativ geringer Menge vorzuliegen. Ein zusätzliches geringes Maximum wurde bei 330 mμ sowohl in neutraler als auch in alkalischer Lösung registriert.

Damit war gezeigt, daß auch aus Fibrinogen sich zwei, den Schauenstein'schen analoge Fraktionen reproduzierbar herstellen lassen.

d. Spezifität der Spaltung.

Es bestand die Frage, ob sich die Spaltung mit CuÄDA von einer bloßen pH-Denaturierung unterschied. Das Spaltungsreagens ist nämlich stark alkalisch, pH = 13,2, und natives Fibrinogen ist in sauren und stark alkalischen Lösungen leicht denaturierbar. Es spaltet sich oberhalb pH = 12,8 in ein Fragment mit dem Molekulargewicht von 230 000 und in 8 Fragmente von MG = 14 500. Ersteres zerfällt in Gegenwart von 6 M Harnstoff weiter in kleinere Einheiten, MG = 14 000 (102, 77). Daher wurden folgende Parallelversuche mit abgeänderten Spaltungsbedingungen durchgeführt:

1. mit CuÄDA, pH = 13,2 (nach Schauenstein),
2. mit CuÄDA, pH = 11,5,
3. mit Äthylendiamin, pH = 11,5,
4. ohne Spaltungsreagens, pH = 13,2.

Nach vier Stunden Einwirkung wurden die Proben dialysiert. Im Retentat von Probe 2. entstand der charakteristische flockige Niederschlag wie bei 1. Bei Probe 3. und 4. fiel das gesamte Protein als kompakte, zähe Masse aus. Die Auswägung der Ausbeuten der getrockneten, unter Schauensteins Bedingungen ausfällbaren Anteile ergab, daß bei pH = 11,5 und 13,2 unter Einfluß des alkalischen Kupferreagenzes reproduzierbare Mengen vom Protein abgespalten wurden Tab. 5, Seite 49).

Tabelle 5. Art und Menge unlöslicher Fibrinogenderivate.

Spaltungsreagens	pH	Art des Niederschlages	Menge	(% v. Fgen)	
CuÄDA	13,2	flockig	73,2 76,2	81,7 69,4	84,1 68,3
CuÄDA	11,5	flockig	74,1 76,3	78,2 76,6	79,3 75,8
ÄDA	11,5	klebrig zäh	98,2	96,7	
-	13,2	klebrig zäh	86,5	95,4	

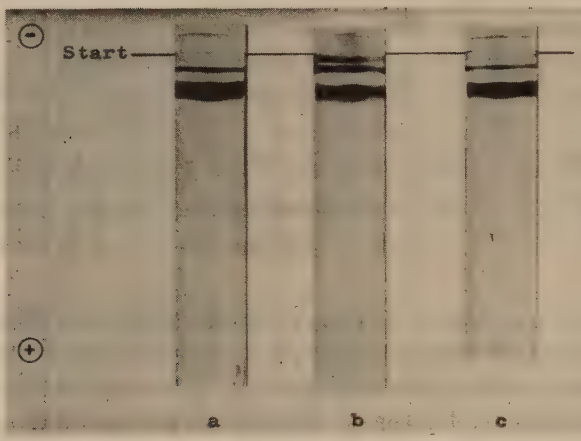
Die Fraktionen Cu-I- und Cu-II-Fibrinogen entstehen demnach auch in einem Bereich unter pH = 12,8, in dem Fibrinogen nicht durch bloße pH-Denaturierung gespalten wird. Wurden Lösung 1. und 2. auf pH = 10,8 unter gleichzeitiger Entfernung des Kupfers umdialysiert, fand auch keine partielle Renaturierung statt, wie sie Fitzgerald und Mitarbeiter (102) bei pH-denaturiertem Material feststellten.

Die Ergebnisse schienen ein Indiz dafür zu sein, daß es sich um eine spezifische Spaltung handelte, verursacht durch die Gegenwart des alkalischen Kupferkomplexes. Der Spaltungsmechanismus blieb ungeklärt.
Um bei den folgenden Versuchen auch eine geringfügige alkalische Hydrolyse weitgehend auszuschalten, wurden die CuÄDA-Spaltungen bei pH = 12,2 durchgeführt.

e. Disk-Elektrophorese.

Das elektrophoretische Verhalten von CuÄDA behandeltem Fibrinogen wurde mit dem von Fibrinogenproben verglichen. Cu-I-Fibrinogen zeigt eine Hauptbande, die im Unterschied zum Ausgangsmaterial geringfügig schneller wanderte (Abb. 16, Seite 50), darüber liegen drei Nebenbanden. Letztere entsprachen lagemäßig den Abbauprodukten bzw. Polymeren des Fibrinogens. Offensichtlich handelt es sich um Aggregate.

Abbildung 16. Disk-Elektrophorese von Cu-I-Fibrinogen.



a = Cu-I-Fibrinogen, b = wie a, gereinigt, c = I_4-Fibrinogen.
Gele: 6 M Harnstoff, Konzentration = 4%,
wirksames pH = 9,2, Laufzeit = 4 Stunden.

Mit dieser Versuchsanordnung war nicht zu entscheiden, ob eine relative Vermehrung negativer Ladungen, ein geringeres Molekulargewicht oder beides die höhere elektrophoretische Beweglichkeit verursachte; wegen der erheblichen Molekülverkleinerung wurde zweites angenommen. Die Läufe erfolgten in 6 M Harnstofflösungen. Unter diesen Bedingungen dissoziiert das größere Fragment Fitzgeralds (102), das bei der alkalischen Hydrolyse gewonnen wird, in Untereinheiten mit dem Molekulargewicht von 14 000. Diesem Wandel ist Fraktion-I offensichtlich nicht unterworfen. Jene kleinen Fragmente müßten sich im 4%igem Gel durch eine erheblich größere Wanderungsgeschwindigkeit bemerkbar machen, ähnlich den nach Spaltung mit Sulfit erhaltenen Derivaten von Fibrinogen (s.u.).

Cu-II-Fibrinogen konnte Disk-elektrophoretisch auch in höher prozentigen Gelen, bis zu 30%, nicht als einheitlich wandernde Bande oder Banden dargestellt werden. Sie waren

mehr oder weniger gleichmäßig über das ganze Gel verschmiert.

f. Ionenaustauschchromatographie.

Die Reinigung bzw. weitere Prüfung auf Einheitlichkeit von Cu-I-Fibrinogen wurde mit Hilfe der Chromatographie an CM-Cellulose versucht. In ersten Versuchen wurde lyophilisiertes Material in 8 M Harnstoff gelöst auf eine Säule von CM-Cellulose aufgetragen, die mit 0,005 M NaAcetat-Puffer in 8 M Harnstoff equilibriert war . Die Elutionsbedingungen waren ausgangs wie in Abb. 6, Seite 30. Die Substanz erschien in einem extrem lang ausgezogenem Gipfel. Auch ein erheblich steilerer Puffergradient bzw. eine Erhöhung der Endkonzentration an Na-Acetat brachte keine besseren Ergebnisse. Die Trennleistung einer Säulenfüllung wurde von Lauf zu Lauf immer schlechter und es war nicht möglich, reproduzierbare Kurven zu erhalten. Für das Versagen dieser Methode sind zwei Gründe anzuführen:

1. Lyophilisiertes Cu-I-Fibrinogen quoll in hochmolaren Harnstofflösungen stark auf und ging ohne Zusatz von Natronlauge nur schwer in Lösung. Trotz anschließender Zentrifugation der Chargen müssen kleinste Molekülaggregate auf die Säule aufgetragen worden sein. Diese Partikel konten nicht sofort durch die Säule wandern, sondern erst verspätet, wenn sich eine höhere Pufferkonzentration eingestellt hatte und sie vollkommen gelöst waren.

2. Cu-I-Fibrinogen begann bei der Präparation während des Neutralisierens bereits von dem Zeitpunkt an auszufallen, als die Lösung noch das ganze Kupfer enthielt. Es war nicht zu vermeiden, daß vom Präzipitat Kupfer eingeschlossen wurde, was an der grünlichen Färbung lyophilisierten Materials zu erkennen war. Die auf die Säule mit aufgetragenen Kupferionen stellten offensichtlich ein starkes Gift für die Austauscher Matrix dar, indem sie sich mit wesentlich höherer Affinität als Wasserstoff- oder Natriumionen mit den

Carboxylgruppen der Cellulose verbanden und diese inaktivierten. Nur durch Äquilibrieren mit Chelatbildnern wie EDTA konnte die Cellulose reaktiviert werden.

g. Änderung der Präparationsbedingungen.

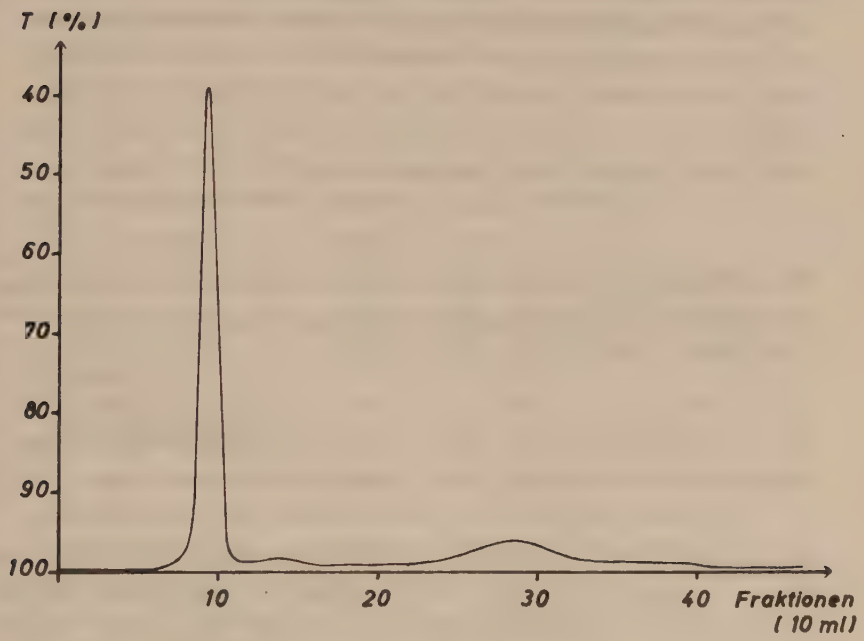
Um bei weiteren Versuchen oben erwähnte Fehlerquellen zu umgehen, wurde die Präparation von Cu-I-Fibrinogen modifiziert. Es wurde dafür gesorgt, daß nach Spaltung des Fibrinogens das Cu-I-Fibrinogen immer in gelöster Form bleibt. Das pH wurde nach der Spaltung mit HCl nur auf 9,0 zurückgestellt, anschließend wurde gegen Harnstoff dialysiert. Sobald das Dialysebad weitgehend entfärbt war, wurde zusätzlich mehrmals gegen EDTA dialysiert, um Restspuren von Kupfer aus dem Protein zu entfernen.

h. Reinigung mit Gelfiltration.

Zur Entmischung der beiden Fraktionen und ihrer gleichzeitigen Reinigung wurde nicht die empfindliche Austauschchromatographie, sondern die Gelchromatographie an Sephadex G-200 herangezogen. Diese Matrix ist ein Polysaccharid in Perlform. In die Maschen der Kugeln können Proteine umso tiefer hineindiffundieren, je kleiner sie sind. Entsprechend länger ist ihre Verweildauer in der Säule, und sie werden später eluiert als größere Moleküle.

In Abb. 17, Seite 53, ist ein Trennversuch wiedergegeben. Mit dem Ausschlußvolumen tritt eine starke Fraktion aus der Säule aus. Im späteren Teil folgen noch niedrigermolekulare Spaltprodukte. Kontrolläufe des ersten, großen Peaks in der Disk-Elektrophorese ergaben, daß sich die Fraktion ähnlich wie Cu-I-Fibrinogen verhielt (vergleich Abb. 16, Seite 50). Von den über der Hauptbande liegenden Nebenbanden trat nur noch die untere, die auch Fibrinogen zeigte, in stark abgeschwächter Form auf. Eine Wiederholung dieses Reinigungsschrittes brachte keine besseren Ergebnisse.

Abbildung 17. Gelchromatographie von Cu-Fibrinogen an Sephadex G-200.



Lösungsmittel: 0,3 M NaCl, 6 M Harnstoff,
Säulenlänge : 100 cm, Elution: 10 ml / Stunde.

i. Analytische Untersuchungen.

a. Aminosäureanalysen.

Die Ermittlung der Aminosäuredaten von Cu-I-Fibrinogen erfolgte wie bei Fibrinogen und Fibrin nach saurer Hydrolyse im Analysator mit automatisierter Registration der Extinktionen (siehe Seite 25). Die Werte sind in Tabelle 6, Seite 54, mit denen von Fibrinogen verglichen.

Bei Cu-I-Fibrinogen ist eine relative Zunahme bei den Dikarbonsäuren sehr deutlich feststellbar, des weiteren bei Ile, Leu und Lys. Zum Teil stark fallen Pro, Gly, Cys/2,

Met und His ab. Die stärkere anodische Beweglickeit von Cu-I-Fibrinogen in der Elektrophorese findet auch ihre Erklärung in der Zunahme der beiden sauren Aminosäuren, die bei nur geringfügig angestiegenem relativen Arg-Gehalt nicht durch eine Zunahme der Base Lys kompensiert wurde.

Tabelle 6. Aminosäuren Zusammensetzung von Fibrinogen und Cu-I-Fibrinogen (Reste / 1000 Reste).

Aminosäure:	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys/2
Fibrinogen:	117,6	68,2	69,7	112,7	52,7	93,3	45,5	19,6
Cu-I-Fgen:	136,6	95,0	68,5	126,8	35,5	63,4	41,4	15,7

Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Trp
57,3	19,9	42,9	62,4	37,4	33,5	20,7	66,7	54,7	25,2
45,4	14,4	49,4	67,7	34,5	32,6	15,9	79,0	53,6	24,6

Als Nebenergebnis wurden Daten für Glucosamin mitausgewertet. Dieser Aminozucker trat bei Trennungen am Analysator hinter Tyrosin auf. $GlcNH_3$ wurde wie Cys/2 durch Vergleich mit einem oxidierten Testgemisch ermittelt: $GlcNH_3$ = 4,0 Reste bei Cu-I-Fibrinogen.

ß. Zuckerbestimmungen.

Die Hexosen wurden nach der modifizierten Anthron Methode bestimmt (siehe Seite 35), Glucosamin 1. nach der automatisierten Methode von Balazs (95, siehe Seite 35), 2. im Rahmen der Aminosäureanalysen (Umrechnung letzteren Wertes in %: 1000 Aminosäuren von Cu-I-Fibrinogen wogen 132 400g; die vier $GlcNH_3$-Reste 662 g, das sind 0,54%). In Tabelle 7, Seite 55 sind die für Cu-I-Fibrinogen erhaltenen Werte mit denen von Fibrinogen verglichen.

Die scheinbare Zunahme der Hexosen läßt sich damit deuten, daß ein Teil des Fibrinogen Moleküls abgebaut wurde in

Bereichen, die relativ arm an Hexosen sind.

Tabelle 7. Hexosen und Glucosamin Gehalt von Fibrinogen und Cu-I-Fibrinogen.

	Hexosen	Glucosamin	1.*	2.*
Fibrinogen:	1,56 %		0,58 %	-
Cu-I-Fgen:	1,96 %		0,58 %	0,54 %

* Bestimmungsmethode siehe Seite 54.

V. S-sulf-Derivate von Kupferäthylendiamin behandeltem Fibrinogen.

a. Vorbemerkungen.

Wie oben mitgeteilt, wurde eine modifizierte Präparationstechnik zur Herstellung von Cu-I-Fibrinogen entwickelt. Hierbei blieb das Cu-Fibrinogen in gelöster Form erhalten, was eine schonende Weiterbearbeitung erlaubte. Dennoch wurde kein Puffersystem gefunden, mit dem reproduzierbare Chromatogramme von Cu-I-Fibrinogen mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie zu erhalten waren. Diese und weitere, oben besprochene Schwierigkeiten sollten umgangen werden können, wenn es gelänge, Cu-I-Fibrinogen in eine "handlichere" Form zu überführen.

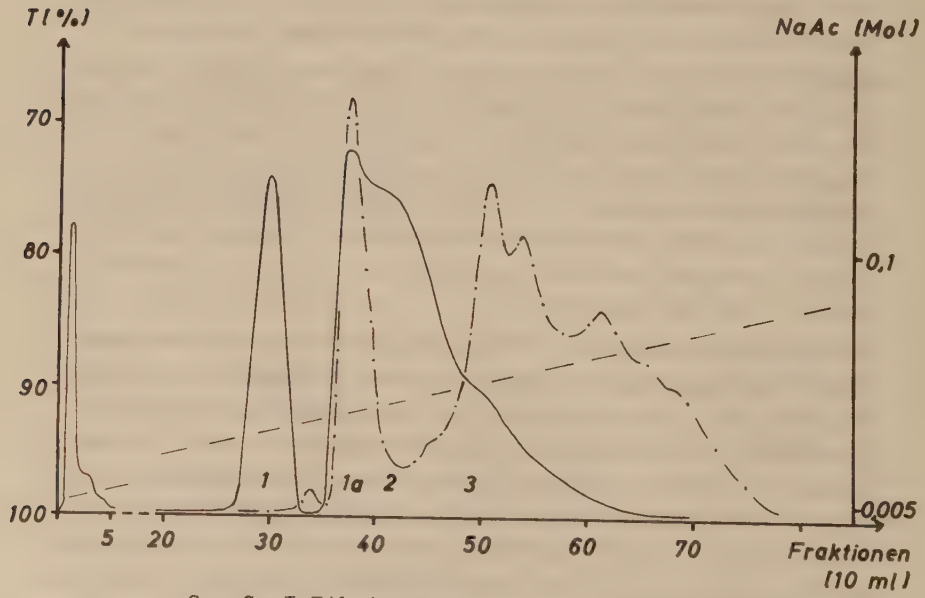
Aus den Ergebnissen von UV-Spektroskopie, Disk-Elektrophorese, Aminosäureanalysen u.a.m. wurde gefolgert, daß Cu-I-Fibrinogen ein Core-Protein des im verhältnismäßig geringem Umfang abgebauten Fibrinogen Moleküls ist. Aus diesem Grunde bot sich, weiteren Untersuchungen vorausgehend, der Abbau von Cu-I-Fibrinogen mit der Sulfit Methode an. Da bei Verwendung der Sulfit Methode ganz spezifisch die Disulfidbrücken gespalten werden, müßte das Core-Protein, analog zu Fibrinogen und Fibrin, in drei Fragmente zerfallen. Von diesen wurde erwartet, daß sie direkten experimentellen

Vergleichen mit den jeweiligen Polypeptidketten des Fibrinogens zugänglich sind und, daß rückschließend die so gewonnenen Ergebnisse zur Charakterisierung der Gesamtfraktion-I beitragen können.

b. Isolierung der Proteinanteile.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit Cu-Fibrinogen war die Austauschchromatographie seiner S-sulf-Derivate gut reproduzierbar. Neben einem sehr gut isolierten ersten Peak trat ein zweiter breit ausgezogener Gipfel mit zwei Schultern auf (Abb. 18).

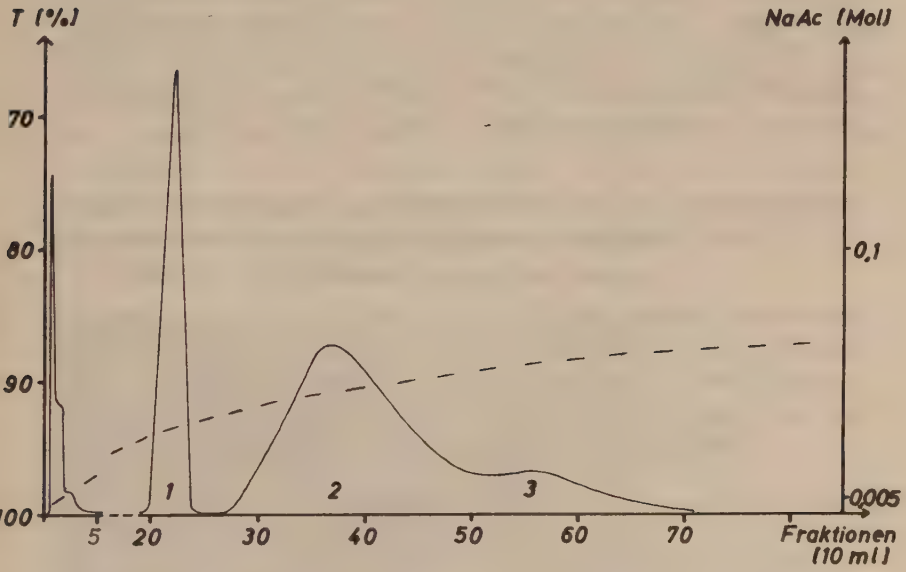
Abbildung 18. Chromatographie von S-sulf-Cu-I-Fibrinogen an CM-Cellulose im Vergleich mit S-Sulf-Fibrinogen.



——— = S-s-Cu-I-Fibrinogen, -·-·- = S-s-Fibrinogen, - - - = Gradient, sonstige Laufbedingungen siehe Abb. 6, Seite 30.

Um die geringe Auflösung der zweiten Chromatogrammhälfte zu verbessern, wurde dieser Abschnitt unter Anlegen eines konvexen Puffergradienten mit veränderter Salzkonzentration gespreitzt (Abb. 19).

Abbildung 19. Chromatographie von S-sulf-Cu-I-Fibrinogen an CM-Cellulose.



——— = S-s-Cu-I-Fibrinogen, - - - = Gradient,

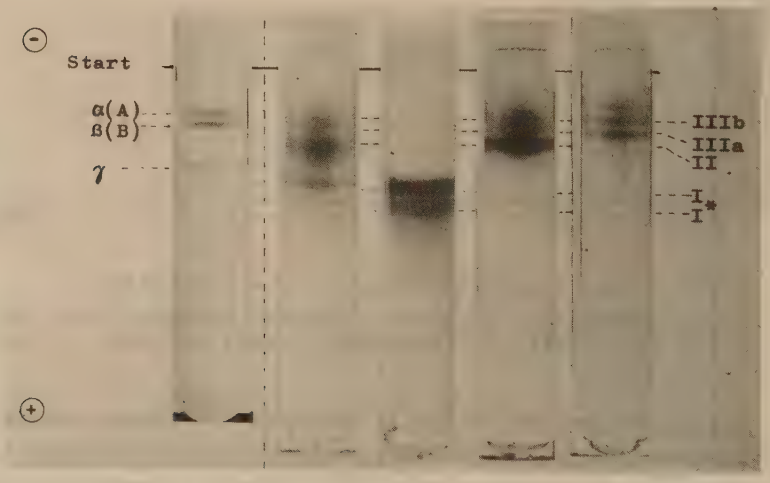
Laufbedingungen: Gradient = konvex, Limitpuffer = 500 ml 0,075 M NaAcetat, 8 M Harnstoff, sonst wie Abb. 6, Seite 30.

Die Ergebnisse der Säulentrennung mit linearem Gradienten sind in Abb. 18 mit einem Trennbild von sulfitolysiertem Fibrinogen, das nicht mit CuÄDA behandelt worden war, verglichen. Bei ähnlichem Trennbild erfolgte die Elution der Spaltpeptide von Cu-I-Fibrinogen früher, d.h. die Proteinanteile enthielten insgesamt mehr saure Gruppen.

c. Disk-Elektrophorese.

Das S-sulf-Derivat von Cu-I-Fibrinogen ergab in der Disk-Elektrophorese eine Auflösung in drei Banden: I, II und III (von unten). Allerdings wanderten sie vergleichsweise schneller als die Fraktionen von sulfitolysiertem Fibrinogen. Dieser Effekt war hinreichend durch das geringere Molekulargewicht und den Verlust basischer Gruppen erklärbar. Alle drei Banden waren diffus aber deutlich abgegrenzt; unter Bande I war von Fall zu Fall eine weitere angedeutet: I^*. Bande III war schwierig darzustellen, ohne daß Bande II alles überdeckte. Das Protein in Bande III lag offensichtlich nur in geringer Konzentration vor (Abb. 20).

Abbildung 20. Disk-Elektrophorese von S-sulf-Fibrinogen, S-s-Cu-I-Fibrinogen und dessen chromatographisch getrennten Fraktionen 1, 2 und 3.



Gele : Konzentration = 7,5%, 6 M Harnstoff,
Laufzeit: 4 Stunden, wirksames pH = 9,2.

Chromatographisch isolierte Fraktionen zeigten teilweise Veränderungen. Fraktion 1 spaltete in zwei Banden auf, von denen die obere gleich schnell wie Bande I wanderte. Daneben trat die schon vorher beschriebene, schwach angedeutete Bande I^* in anteilsmäßig bedeutsamer Menge auf. Die Heterogenität war also mit einem ungenügend arbeitenden Trennsystem zu erklären. Fraktion 2 erschien einheitlich als Bande II. Fraktion 3 spaltete ebenfalls in zwei Anteile auf. Die Austauscher Matrix verhielt sich offensichtlich nicht ganz indifferent gegenüber S-sulf-Cu-I-Fibrinogen. Jedoch schienen die Heterogenitäten schon präformiert zu sein, was das gelegentliche Auftreten von I^* bei Trennungen in Disk-Gelen vor Chromatographie andeutete. Die Proben für die Disk-Elektrophorese in Abb. 20 wurden direkt den Hauptfraktionen des chromatographischen Trennversuches von Abb. 19 entnommen. Das gestattete einen groben Mengenvergleich: Fraktion 3 war nur schwach vertreten.

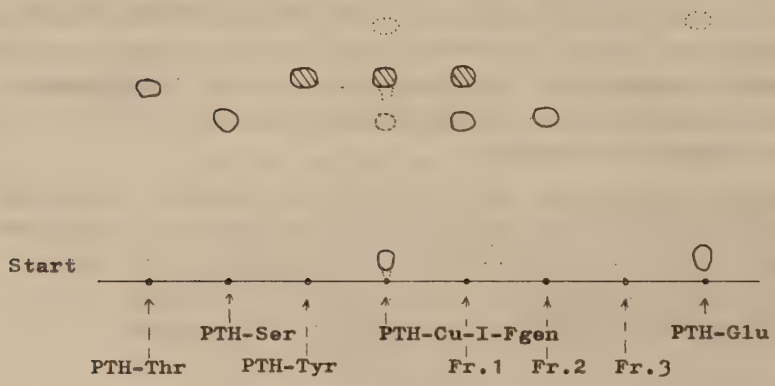
Chromatographie und Disk-Elektrophorese machen wahrscheinlich, daß die Fraktion 1, 2 und 3 Derivate von γ, ß(B) und α(A) sind. Von der Spaltung waren ß(B) und γ zwar verändert, aber mengenmäßig nicht wesentlich reduziert. Die α(A)-Ketten waren dagegen weitgehend verlorengegangen.

d. N-terminale Aminosäureanalysen.

Für das ungespaltene Fibrinogen hatten sich erwartungsgemäß die Aminoendgruppen Tyr und Glu ergeben. Das unsulfitolysierte Cu-I-Fibrinogen wies als Aminoendgruppen Tyr, etwas Ser und Glu auf. Fraktion 1 aus dem sulfitolysierten Material enthielt als Endgruppen Tyr und Ser. Offensichtlich ist die Fraktion nicht einheitlich (siehe oben). In Fraktion 2 fand sich endständig nur Ser, während bei Fraktion 3 unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Aminoendgruppe in Erscheinung trat (bei der Bestimmung wurde so verfahren, daß jeweils die in einem Lauf getrennten Polypeptidketten zur Analyse herangezogen wurden. Bei gepoolten

Proben traten insbesondere bei Fraktion 3 eine Vielzahl schwacher Flecken auf) (Abb. 21).

Abbildung 21. Dünnschichtchromatogramm der PTH-Derivate von S-sulf-Cu-I-Fibrinogen und seiner Fraktionen 1, 2 und 3.



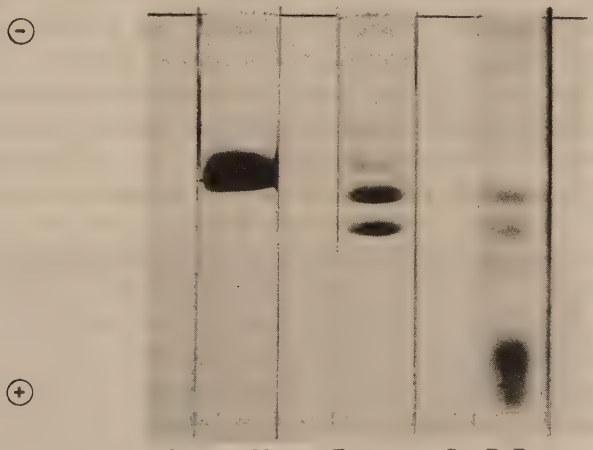
Die Ergebnisse der Engruppenbestimmungen gestatten eine weitere Zuordnung der Polypeptidketten des Cu-I-Fibrinogens zu denen des Fibrinogens: Fraktion 1 erscheint als Derivat der γ-Kette, Fraktion 2 als das der ß(B)-Kette und Fraktion 3 scheint ein Derivat der α(A)-Kette zu sein.

e. Molekulargewichtsbestimmungen.

Um einen genaueren Einblick in den Umfang des Abbaues der Einzelketten zu erhalten, wurden Molekulargewichtsbestimmungen durchgeführt. Hierzu wurde ein Verfahren herangezogen, das eine Variante der Disk-Elektrophorese darstellt,

die SDS-Disk-Elektrophorese (SDS = Sodium-Dodecyl-Sulfat). Die zugegebenen Dodecylsulfat Ionen lagern sich um die Proteinmoleküle und versehen sie mit einer unverhältnismäßig hohen negativen Ladung. Dadurch wird deren Eigenladung vernachlässigbar klein, und bei der Trennung kommt nur der Molekularsiebeffekt zur Wirkung (98). Um eine ausreichende Beweglichkeit zu erreichen, werden mehrkettige Proteine in Gegenwart von Mercaptoäthanol gespalten. Die Trennung erfolgte nach Weber und Osborn (103) in der Regel in einem 10 %igem Gel, in besonderen Fällen in 12,5 %igen Gelen (Abb. 22).

Abbildung 22. SDS-Disk-Elektrophorese von Serumalbumin, Fibrinogen und Cu-I-Fibrinogen.



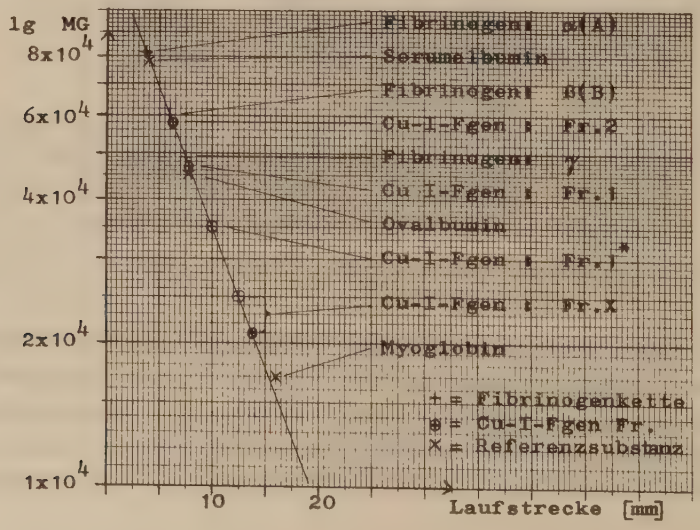
Gelkonzentration = 10 %, pH = 7,2, Laufzeit = 18 Stunden.

Die verschiedenen Banden von Fibrinogen und Cu-I-Fibrinogen wurden durch Parallelläufe mit ihren chromatographisch gereinigten Fraktionen identifiziert. Da die γ-Kette die leichteste des Fibrinogens ist, wanderte sie am schnellsten. Die mit ihr vergleichbare Fraktion 1 des Cu-I-Fibrinogens

hat sich in zwei Anteile aufgespalten, wobei der schwerere geringfügig schneller wanderte als die γ-Kette. Fraktion 2 blieb homogen; sie wanderte ebenfalls nur geringfügig schneller als ß(B). Fraktion 3, vergleichbar mit α(A), war in Höhe dieser nur in Spuren auszumachen. An ihrer Stelle war weit unten eine neue, breite anfärbbare Zone, X, aufgetreten. Im 12,5 %igem Gel war andeutungsweise zu erkennen, daß sie im wesentlichen aus zwei Banden bestand.

Die Wanderungsgeschwingigkeit von Referenzsubstanzen: Humanserumalbumin (MG = 67 000), Ovalbumin (MG = 45 000) und Myoglobin, Pferd (MG = 17 000), wurden gegen den Logarithmus ihrer Molekulargewichte aufgetragen und deren Punkte durch eine Gerade verbunden. Auf dieser Eichkurve, die bei jedem Lauf neu bestimmt wurde, läßt sich aus der Beweglichkeit der untersuchten Proteinfraktionen ihr Molekulargewicht ablesen. Ovalbumin und Serumalbumin bilden Dimere, letzteres sogar Trimere, die bei reichlicher Substanzauftragung auch zur Auswertung herangezogen werden können (Abb. 23).

Abbildung 23. Auswertung eines Laufes mittels Eichkurve.



Die gefundenen Molekulargewichte sind in Tab. 8 angegeben.

Tabelle 8. Die Molekulargewichte der Polypeptidketten von Fibrinogen und Cu-I-Fibrinogen.

Protein \ Autor	Mills et al. (104)	eigene Werte
Fibrinogen		
α(A)	73 000, 70 000	70 000
ß(B)	58 000	59 000
γ	47 000	49 000
Cu-I-Fibrinogen		
II	-	58 000
I	-	47 000
I*	-	36 000
X	-	22 000 - 26 000

Die Ergebnisse für Fibrinogen entsprechen denen von Mills und Karpatkin (104) mit gleicher Methode gefundenen Werten. Aus der doppelten Summe der Molekulargewichte der Einzelketten errechnet sich jenes des Fibrinogens zu 356 000 (353 000 bei Mills et al.). Für Cu-I-Fibrinogen ließ sich jenes Gewicht nicht genau bestimmen, da nicht ermittelt werden konnte, in welchen molaren Gewichtsverhältnissen die Komponenten I und I* zueinander standen. Unter grober Auswertung der Farbintensitäten beider Banden war Komponente I mindestens doppelt so stark wie I* vertreten. Ohne Berücksichtigung der nicht angegriffenen α(A)-Ketten, die nur spurenhaft aufgetreten sind, käme dem Cu-I-Fibrinogen ein Molekulargewicht von 250 000 zu, das wären 70 % des Fibrinogen Moleküls.

D. Diskussion.

Im ersten Teil meiner Arbeit bestand für mich die Aufgabe, Methoden für die Charakterisierung und Untersuchung von Fibrinogen einzuführen, wobei sowohl bekannte Verfahren auf ihre Brauchbarkeit geprüft als auch neue entwickelt werden sollten. Außerdem sollte Fibrinogen und daraus hergestelltes Fibrin durch ihre Aminosäurezusammensetzung, ihre Aminoendgruppen und den Kohlenhydratgehalt charakterisiert werden.

Für die rasche Untersuchung von Fibrinogen auf Einheitlichkeit erwies sich die Methode der Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgel brauchbar. Dabei zeigte es sich, daß käufliche Präparate von Rinderfibrinogen, die meist einige Zeit gelagert waren, neben Verunreinigungen noch relativ große Mengen an Polymeren enthielten, die durch Fällungsoperationen nur teilweise entfernt werden konnten. Aus frischem Rinderblut hergestelltes Fibrinogen ließ dagegen nur geringe polymere Anteile erkennen (Abb. 3). Von diesem Material und von daraus hergestelltem Fibrin wurde die genaue Aminosäurezusammensetzung bestimmt (Tab. 2).

Von besonderer Bedeutung war es, Methoden für die analytische und präparative Trennung der Peptidketten des Fibrinogens zu finden, die bei einer Spaltung der Disulfidbindungen mit Sulfit in harnstoffhaltiger Lösung frei werden. Für eine säulenchromatographische Auftrennung der Spaltprodukte erwies sich CM-Cellulose als am besten geeignet. Besonders gut trennten sich dabei die γ-Ketten ab, aber auch die α(A)- und ß(B)-Ketten konnten befriedigend gut voneinander isoliert werden (Abb. 6). Versuche an DEAE-Cellulose verliefen nur unbefriedigend. Wegen der starken Aggregationstendenz der Einzelketten mußten die Proben in 8 M Harnstoff chromatographisch getrennt werden. Die erhaltenen Fraktionen waren durch Analyse ihrer Aminoendgruppen zugeordnet worden. Erstmals wurde ihr Kohlenhydratgehalt bestimmt (Abb. 8, Tab. 4).

Bei Chromatographie an CM-Cellulose unterschieden sich die

Trennbilder von sulfitolysiertem Fibrinogen und sulfitolysiertem Fibrin-s deutlich. Die α- und ß-Ketten von Fibrin-s wanderten erheblich langsamer als die α(A)- und ß(B)-Ketten von Fibrinogen, während die γ-Ketten der beiden Proteine die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit aufwiesen (Abb. 7). Dieses Verhalten war zu erwarten, da bei der Überführung von Fibrinogen in Fibrin die negativ geladenen Fibrinopeptide A und B von den α(A)- und ß(B)-Ketten des Fibrinogens abgespalten werden. Hervorzuheben ist jedoch der große Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit, der vielleicht auch dafür herangezogen werden kann, zwischen Derivaten des Fibrinogens und des Fibrins zu unterscheiden.

Für die analytische Trennung der Peptidketten des Fibrinogens und Fibrins wurde von mir erstmals die Elektrophorese an Polyacrylamidgel erfolgreich herangezogen, nachdem eine Elektrophorese auf Papier oder Stärkegel unbefriedigende Ergebnisse gebracht hatte. In 6 M Harnstoff trennten sich bei pH = 9,2 alle drei Peptidketten deutlich voneinander ab (Abb. 10). Offensichtlich wirken unter diesen Bedingungen Unterschiede der Ladung und des Molgewichtes gleichermaßen im Sinne einer deutlichen Trennung. Die einzelnen Fraktionen wurden durch Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeit mit den säulenchromatographisch getrennten Peptidketten identifiziert. Nach Abschluß und Veröffentlichung der eigenen Versuche (101) erschienen mehrere Mitteilungen anderer Arbeitskreise, die unabhängig von meinen Ergebnissen Untersuchungen zur Trennung der Peptidketten durchgeführt hatten und gleiche Bedingungen wie die von mir erarbeiteten als optimal erkannt hatten (106, 107).

Auch bei Elektrophorese an Polyacrylamidgel unterschieden sich die α- und ß-Ketten von Fibrin-s durch eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit von den α(A)- und ß(B)-Ketten des Fibrinogens (Abb. 14). Die Unterschiede waren jedoch weniger stark ausgeprägt als bei der Chromatographie an CM-Cellulose. Eine Zuordnung von Fibrinogen oder Fibrin durch Disk-Elektrophorese der getrennten Peptidketten ist somit zwar möglich jedoch mit

stärkeren Unsicherheiten belastet.

Seit dem experimentellen Abschluß der vorliegenden Arbeit hat die Auftrennung der Einzelketten, die bei der Sulfitolyse von Fibrinogen frei werden, eine erhebliche Bedeutung für die Charakterisierung von Fibrinogen Derivaten erlangt. Insbesondere wurde festgestellt, daß bei Derivaten des Fibrinogens, die eine höhere Löslichkeit und längere Gerinnungszeit aufweisen, die α-Ketten nur mehr in Spuren nachweisbar waren. Außerdem wurde mit dieser Methode gezeigt, daß bei einer covalenten Vernetzung von Fibrin durch Faktor XIII γ-Ketten miteinander verbunden werden (105, 56, 57, 58).

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Methoden zur Charakterisierung von Fibrinogen angewandt, um die Veränderungen zu untersuchen, die Fibrinogen bei einer von Schauenstein (75) für Fibrinogen beschriebenen Behandlung mit Kupferäthylendiamin unter alkalischen Bedingungen erleidet. Nach dieser Behandlung wurden, den Angaben Schauensteins folgend, zwei Fraktionen von abgebautem Fibrinogen erhalten, von denen die größere, das schwer lösliche Cu-I-Fibrinogen, mindestens 70 % des eingesetzten Materials bestreitet. Es konnte gezeigt werden, daß durch Kupferäthylendiamin eine spezifische Spaltung erfolgt, und daß der Abbau nicht allein durch eine alkalische Denaturierung zu erklären ist.

Cu-I-Fibrinogen, in 6 M Harnstoff gelöst, wanderte in der Disk-Elektrophorese als scharfe Bande mit etwas größerer Geschwindigkeit als Fibrinogen. Außerdem waren noch Polymere nachweisbar (Abb. 16). Das Präparat kann daher als abgewandeltes Fibrinogen betrachtet werden. Cu-II-Fibrinogen dagegen bestand aus zahlreichen Proteinfraktionen, die sich über das ganze Gel verteilten. Sie wanderten auch in 30 % Gel in erheblichem Maße ein, was dafür spricht, daß es sich um vergleichsweise niedrigmolekulare Abbauprodukte handelt.

Nach diesem Ergebnis wurde ausschließlich Cu-I-Fibrinogen weiter untersucht. Diese Fraktion war nur in konzentrierten

Harnstofflösungen löslich, weshalb lediglich solche Untersuchungen durchgeführt werden konnten, bei denen die Erhaltung der Tertiärstruktur nicht von Bedeutung war. Zur besseren Darstellung wurde die Fraktion jetzt aus dem gesamten Reaktionsgemisch, das in 6 M Harnstoff gelöst war, durch Molekularsiebchromatographie an Sephadex G-200 gewonnen. Cu-I-Fibrinogen wanderte dabei mit der Lösungsmittelfront und trennte sich von den niedrigermolekularen Peptiden gut ab (Abb. 17). Reinigungsversuche durch Chromatographie an Ionenaustauschersäulen hatten keine befriedigenden Ergebnisse gebracht.

Die Aminosäurenzusammensetzung von Cu-I-Fibrinogen ähnelte zwar der von Fibrinogen, zeigte aber einige deutliche Unterschiede. Insbesondere fiel der erheblich geringere Anteil an Prolin und Glycin auf, sowie ein verminderter Gehalt an Cystin und Histidin. Dagegen waren Asparagin- und Glutaminsäure deutlich erhöht (Tab. 6). Prolin kommt nicht in helicalen Bereichen der Peptidketten vor, und auch Glycin ordnet sich dort weniger gut ein. Das läßt darauf schließen, daß nichthelicale Bereiche der Peptidketten beim Abbau bevorzugt angegriffen wurden. Der Hexosengehalt von Cu-I-Fibrinogen war gegenüber dem Ausgangsmaterial deutlich erhöht, während sich der Gehalt an Aminozuckern nicht änderte (Tab. 7). Offenbar bleiben die hexosenhaltigen Bezirke vom Abbau durch Kupferäthylendiamin verschont.

Wesentliche Einblicke in die Veränderungen, die Fibrinogen beim Übergang in Cu-I-Fibrinogen erleidet, waren möglich, als man die Disulfidbindungen von Cu-I-Fibrinogen mit Sulfit spaltete und die frei gelegten Peptidketten auftrennte. Bei einer chromatographischen Auftrennung an CM-Cellulose wurde ein Trennbild erhalten, das dem von sulfitolysiertem Fibrinogen ähnelte. Die Fraktionen wanderten allerdings etwas rascher durch die Säule, und die Auftrennung war etwas schlechter. Bei Anwendung eines konvexen Puffergradienten gelang es aber, drei deutlich voneinander getrennte

Fraktionen zu erhalten (Abb. 18, 19). Dabei fiel auf, daß die am langsamsten wandernde Fraktion vergleichsweise nur in sehr geringer Menge vorhanden war.

Auch bei der Disk-Elektrophorese von sulfitolysiertem Cu-I-Fibrinogen wurden im wesentlichen drei Banden erhalten, die zueinander in einem ähnlichen Verhältnis standen wie die α(A)-, ß(B)- und γ-Fraktion von sulfitolysiertem Fibrinogen, jedoch alle etwas rascher wanderten als die Vergleichssubstanzen (Abb. 20). Untersuchungen der zuerst an CM-Cellulose getrennten Fraktionen ergab, daß diejenige Fraktion, die am raschesten bei sehr niedrigem pH aus der Säule trat, auch in der Disk-Elektrophorese bei hohem pH am schnellsten wanderte und umgekehrt. Einige der Fraktionen spalteten dabei in zwei nahe beieinander liegende Banden auf. Die Farbintensität der Banden der am langsamsten wandernden Fraktion war am geringsten.

Die Ähnlichkeit der Trennbilder von sulfitolysiertem Fibrinogen und von sulfitolysiertem Cu-I-Fibrinogen sowohl bei der Chromatographie an CM-Cellulose wie bei der Elektrophorese an Polyacrylamidgel ließ darauf schließen, daß die drei Fraktionen von sulfitolysiertem Cu-I-Fibrinogen Derivate der entsprechenden Peptidketten des Fibrinogens darstellen. Diese Vorstellung konnte zumindest für die Fraktion 1 als Abkömmling der γ-Ketten durch Bestimmung der N-terminalen Aminosäure erhärtet werden. Diese Fraktion, die in der Disk-Elektrophorese in zwei Unterbanden aufspaltete, enthielt aminoendständig Tyrosin und Serin. Tyrosin ist die Aminoendgruppe der γ-Kette von Rinderfibrinogen, so daß eine entsprechende Zuordnung begründet ist. Aus der ß(B)-Kette, die keine freie Aminoendgruppe aufweist, geht nach den genannten Analogieschlüssen Fraktion 2 mit aminoendständigem Serin hervor. Fraktion 3, das Derivat der α(A)-Ketten, trat nur in geringer Menge auf und ergab bei der Endgruppenbestimmung keine eindeutigen Ergebnisse (Abb. 21).

Die drei Fraktionen von sulfitolysiertem Cu-I-Fibrinogen

wurden auch an Polyacrylamidgel in Gegenwart von Na-Dodecylsulfat aufgetrennt und aus der Wanderungsgeschwindigkeit ihr Molgewicht bestimmt. Ein Vergleich mit den α(A)-, ß(B)- und γ-Ketten von sulfitolysiertem Fibrinogen ergab, daß Fraktion 2 ein ähnliches Molgewicht wie die ß(B)-Kette aufweist. Fraktion 1 bestand aus zwei Anteilen, von denen einer nur wenig kürzer als die γ-Kette war, während der zweite eine stärkeren Abbau erfahren hatte. Eine der α(A)-Kette (Mol-Gew. 70 000) entsprechende Fraktion fehlte in sulfitolysiertem Cu-I-Fibrinogen. An ihrer Stelle trat eine verbreiterte Bande entsprechend einem Mol-Gew. von nur 22 - 26 000 auf (Abb. 22, Tab. 8).

Aus den angeführten chromatographischen und elektrophoretischen Befunden kann man schließen, daß in Cu-I-Fibrinogen die drei Peptidketten des Fibrinogens in unterschiedlichem Maße erhalten sind. Die geringsten Veränderungen scheinen die ß(B)-Ketten erlitten zu haben. Die veränderte Wanderungsgeschwindigkeit dürfte weniger auf eine Abnahme des Mol-Gewichtes als vielmehr auf Veränderungen in den Seitenketten, die Ladungsveränderungen mit sich bringen, zurückzuführen sein. Wahrscheinlich wurde lediglich ein kurzes Peptid mit einem ungefähren Mol-Gewicht von 1000 vom Aminoende abgespalten. Die γ-Ketten hatten beim Abbau unterschiedlich stark gelitten. Ein Teil wurde nur um ein Mol-Gewicht von 2000 verkleinert, während vom anderen Bruchstücke mit Mol-Gewichten von insgesamt 13 000, wahrscheinlich vom C-terminalen Ende (109), abgespalten wurden. Den stärksten Angriff hatten die α(A)-Ketten erfahren. Von ihnen verblieben lediglich Reste mit Mol-Gewichten von 22 - 26 000.

Trotz des teilweise recht erheblichen Abbaues scheint sich die Ladung der Peptidketten, die für die Wanderung an CM-Cellulose den entscheidenden Faktor darstellt und die auch bei der Elektrophorese stark ins Gewicht fällt, nicht sehr verändert zu haben. Dies kann man aus der Ähnlichkeit der Trennbilder von sulfitolysiertem Fibrinogen und Cu-I-Fibrinogen

schließen. Offensichtlich wurden beim Abbau im wesentlichen neutrale Bezirke erfaßt, wie bereits oben erwähnt. Auch Argininreste dürften abgespalten worden sein. Dadurch erscheinen die Aminosäuren mit sauren Seitenketten in Cu-I-Fibrinogen relativ erhöht, was die etwas größere Wanderungsgeschwindigkeit der Fraktionen sowohl bei Chromatographie an CM-Cellulose als auch bei der Disk-Elektrophorese erklärt.

Die vorliegenden Ergebnisse besagen, daß bei der Behandlung von Fibrinogen mit Kupferäthylendiamin vor allem die α(A)-Ketten angegriffen werden. In wesentlich geringerem Maße werden auch die γ-Ketten erfaßt, während die ß(B)-Ketten nur einen geringfügigen Abbau erleiden. Dieses Ergebnis steht in gewisser Analogie zu Befunden von Gaffney und Dobos (108) über den enzymatischen Abbau von Fibrinogen mit Plasmin. Eine kinetische Verfolgung des Abbaues ergab, daß zuerst die α(A)-Ketten angegriffen werden, und erst wesentlich später die ß(B)- und γ-Ketten.

Eine weitere interessante Analogie besteht in der Tatsache, daß in letzter Zeit mehrere Begleiter des Fibrinogens aus Blut isoliert wurden, in denen die α(A)-Ketten nur in geringer Menge nachweisbar waren (105). Diese Derivate wiesen eine höhere Löslichkeit als Fibrinogen auf und benötigten längere Zeit zum Gerinnen. Möglicherweise handelt es sich auch hier um teilweise abgebautes Fibrinogen, das aber noch gerinnbar ist. Nachdem Cu-I-Fibrinogen in Gegenwart von Harnstoff hergestellt wurde, ließ sich kein positiver Beweis für seine Gerinnungsfähigkeit finden, wie auch Harnstoff denaturiertes Fibrinogen bisher nicht mehr zur Gerinnung gebracht werden konnte.

Diese Ergebnisse geben Anlaß zu Überlegungen über die Struktur von Fibrinogen. Die Empfindlichkeit der α(A)-Ketten läßt darauf schließen, daß diese Ketten im nativen Protein nur wenig helicale Bezirke aufweisen, die sie stabilisieren könnten. McKee et al. (109) sowie Cartwright und Kekwick (86) hatten bereits gezeigt, daß diese Ketten einen vergleichsweise

hohen Gehalt an Prolin und Glycin aufweisen, Aminosäuren, die sich nicht oder nur schlecht in eine α-Schraube einordnen. Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, daß diese Aminosäuren beim Abbau mit Kupferäthylendiamin bevorzugt erfaßt werden.

Des weiteren ist anzunehmen, daß sich die α(A)-Ketten an der Oberfläche des Fibrinogens befinden und dadurch einem Abbau besonders gut zugänglich sind. Dies würde in Übereinstimmung mit immunologischen Befunden stehen. Immunisiert man Ratten mit Rinderfibrinogen, dann erhält man im wesentlichen Antikörper, die gegen die α(A)- oder ß(B)-Ketten gerichtet sind, während nur wenige Antikörper mit Determinanten der γ-Ketten reagieren. Die α(A)- und ß(B)-Ketten können immunologisch nur schlecht unterschieden werden (110).

Neuere Ergebnisse von Plow et al. (111) haben gezeigt, daß beim Abbau von Fibrinogen mit Plasmin, bei dem die α(A)-Ketten weitgehend zerstört werden, neue Determinanten an die Oberfläche kommen. Auch dieser Befund würde dafür sprechen, daß die α(A)-Ketten außen gelegen sind und zumindest Teile anderer Ketten umhüllen.

E. Experimenteller Teil.

1. Fibrinogengewinnung aus Rinderblut und Fibrinogenreinigung.

a. Blutgewinnung.

Die ersten Anteile des Blutes, die aus der aufgeschnittenen Carotis eines Rindes ausströmten, wurden verworfen, damit der Großteil der freigewordenen Gewebsproteasen weggespült wurde. Dann wurden 5 Liter Blut unter stetem Umrühren in einer Plastikwanne aufgefangen, in der sich 100 ml einer EDTA-Lösung (5 g / 100 ml) befand. Diese sollte durch Ca-Komplexierung die Gerinnung verhindern. Das Blut wurde in 10 L Plastikflaschen gepoolt. Letztere standen in einem Eimer, der zur Kühlung mit Eis gefüllt war.

b. Plasmagewinnung.

Das Blut wurde in 1 L Bechern 50 Minuten lang bei 2200 UpM und 4°C in der MSE-Major zentrifugiert. Hatte keine Plasmolyse stattgefunden, war der Überstand, das Plasma, goldgelb gefärbt. Dieses wurde vorsichtig, ohne Zellbestandteile aufzuwirbeln, durch einen Plastikschlauch in eine Plastikflasche abgehebert.

c. Fibrinogenisolierung.

Das in einem großen Plastikbecher befindliche Plasma wurde im Kryostaten auf +5°C vorgekühlt (Kühlflüssigkeit = -10°C). Zu 1 L Plasma wurde unter langsamen Rühren tropfenweise 1,2L Fällungsreagens gegeben, so daß die Temperatur des Plasmas nicht über 8°C anstieg. Nach 3 stündigem Rühren bei 5°C wurde bei 2000 g und 5°C abzentrifugiert. Das Präzipitat entsprach der Cohn Fraktion I. Ergab eine Reinheitsprüfung durch Disk-Elektrophorese deutlich die Anwesenheit von weiteren Plasmaproteinen, wurde eine zweite, gleichartige Fällung angeschlossen. Fibrinogen wurde dann in einer 0,15 M NaCl-Lösung gelöst.

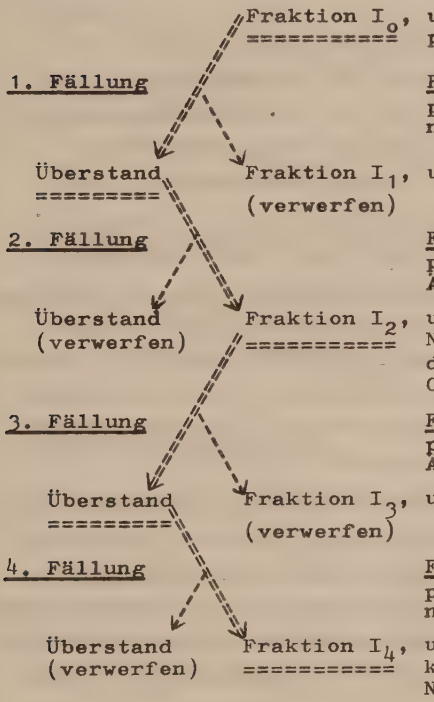
Fällungsreagens: Zu 2L einer 0,2 M ε-Aminocapronsäurelösung, pH = 5,6 mit 25% HCl, wurden 720 g Glycin und 18 g NaCl gegeben und bei 65°C gelöst. Zum Gebrauch wurde die Lösung auf 50°C abgekühlt.

Zur Weiterverarbeitung wurde das I_o-Fgen in einem 0,055 M Citratpuffer gelöst, pH = 6,35, sodaß die Proteinkonzentration 1,5% betrug. Die Lösung wurde über Nacht in den Kühlraum gestellt (6°C). Die ausgefallenen kaltunlöslichen Proteine wurden bei 2000 g und 4°C abzentrifugiert und verworfen.

d. Fibrinogenreinigung.

Die weiteren Reinigung erfolgte nach Blombäck et al. (79), wie es im Schema III wiedergegeben ist.

Schema III. Reinigung von Fibrinogen.



2. Konzentrationsbestimmung.

Einer Fibrinogenlösung wurden drei aliquote Proben entnommen, wenn man von den Parallelproben absieht, und auf 1 ml mit 0,15 M NaCl-Lösung verdünnt, so daß sie maximal 0,35 % Fibrinogen enthielt.

a. Fibrindarstellung.

Zwei der drei Proben wurden mit je 2 ml 0,015 M Phosphatpuffer in 0,075 M NaCl, pH = 6,35, verdünnt und mit 0,15 ml einer Thrombinlösung - 100 NIH/ml - inkubiert (Thrombinum purum, 100 NIH, Behringwerke). Das gebildete Gerinnsel wurde auf einem Nylontuch über Filtrierpapier synerisiert und mehrmals mit 0,15 M NaCl-Lösung gewaschen. Eines der Gerinnsel wurde zur Stickstoffbestimmung, das zweite zur Bestimmung der Gerinnbarkeit verwendet.

b. Fibrinstickstoff (Mikromethode von Strauch, 82).

Der Aufschluß des Proteins erfolgte in Reagenzgläsern, in denen auch die Farbe entwickelt wurde. Der Stickstoffwert des Proteins wurde durch Vergleich der Extinktion seiner Lösung mit denen verschiedener Standardlösungen bestimmt:

Dazu wurde von einer Ammoniumsulfatlösung in 0,2 N Schwefelsäure, enthaltend 100 µg Stickstoff / ml, eine Verdünnungsreihe hergestellt. Je 1 ml dieser Vergleichslösungen und die Proteinproben wurden mit je 2 ml Aufschlußreagens versetzt und in einem Aufschlußgerät erhitzt. Das auf 100°C vorgeheizte Gerät wurde mit den eingesetzten Proben allmählich innerhalb von 30 Minuten auf 320°C hochgeregelt; danach verblieben die Proben weitere 30 Minuten bei 320°C in dem Gerät.

Nach Abkühlen wurden die 0,1 ml Flüssigkeit enthaltenden Proben mit Wasser auf 13 ml aufgefüllt, je 4 ml von diesen Lösungen wurden nach Überführung in andere Reagenzgläser mit je 2 ml Neßlerreagens (nach Koch und McMeekin, 112) beschickt. Nach 15 Minuten erfolgte die Messung der Extinktionen bei 420 mµ und bei 550 mµ (Nullwert) im Spektralphotometer Beckmann DU.

Aufschlußreagens: 2 g Selen in 250 ml heißer, konzentrierter Schwefelsäure lösen. Nach Erkalten unter Kühlung tropfenweise 250 ml gesättigte Kaliumsulfatlösung dazu geben.

c. Bestimmung der Gerinnbarkeit.

Das zweite Fibringerinnsel und die dritte Probe von 1 ml Fibrinogenlösung wurden mit je 10 ml einer 40 % alkalischen Harnstofflösung in 0,2 N NaOH versetzt. Nach einer Stunde wurde die Fibrinlösung durch Zugabe von 1 ml 0,3 M NaCl-Lösung auf das gleiche Lösungsvolumen wie die Fibrinogenlösung gebracht. Nach weiteren vier Stunden wurden die Extinktionen im Spektralphotometer Beckmann DU gemessen. Ausgewertet wurden die Extinktionsdifferenzen $\Delta E_{282/320}$.

Berechnung von Konzentration und Koagulierbarkeit.

Fibringehalt = G : (N = mg Fibrin Stickstoff)

$$G = N \times 5{,}92 \quad [\text{mg Fibrin / ml Ausgangslösung}]$$

Koagulierbarkeit = K :

$$K = \frac{(\Delta E_{Fin} + P) \times 100}{\Delta E_{Fgen}} \ \%\ , \quad \left(P = \frac{\Delta E_{Fgen} \times 2}{100}\right)$$

(P = Einrechnungsfaktor für Verlust der Fibrinopeptide)

Fibrinogen Extinktionskoeffizient :

$$\varepsilon^{1\%}_{1cm} = \frac{\Delta E_{Fgen} \times K \times 1{,}1}{N \times 6{,}02}$$

3. Aminosäureanalyse.

a. Perameisensäureoxidation zur Cysteinbestimmung.

1,5 ml Proteinlösung wurde in Gegenwart einer Prise NaCl durch 0,5 ml Perameisensäure im Wasserbad bei 50°C oxidiert. Nach 15 Minuten wurde die Säure durch Zugabe von einigen ml Wasser zerstört. Die Probe wurde im Vakuum mehrmals eingetrocknet und dazwischen wieder mit Wasser versetzt.

Perameisensäure: 0,5 ml 30 % H_2O_2 + 4,5 ml HCOOH bei 50°C mischen. Nach 3 Minuten vor Versuch ansetzen.

b. Hydrolyse.

1,5 mg oxidiertes bzw. nichtoxidiertes Protein wurden mit 1 ml 6 N HCl versetzt und unter Stickstoffatmosphäre im zugeschmolzenen Hydrolysekölbchen während 24 Stunden bei 110°C hydrolysiert und danach am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Zur vollkommenen Entfernung von Salzsäure wurde letzterer Vorgang mehrmals wiederholt, nachdem das Hydrolysat mit Wasser versetzt worden war.

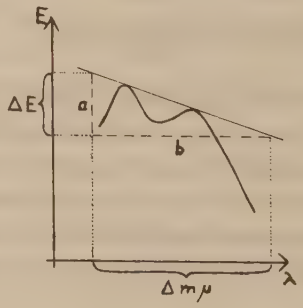
c. Aminosäurenanalyse.

Die Trennung der Aminosäuren erfolgte in Aminex A-6 Säulen (9 x 590 mm) des Analysators BC 200 "Biochrom" (Fa. Bio-Cal-Instruments, Gräfelfing b. München). Die aufgetrennten Aminosäuren wurden im gleichen Arbeitsgang mit Ninhydrin angefärbt und dessen Extinktion automatisch registriert. Die erhaltenen Kurven wurden planimetriert und die Mengen an Aminosäuren durch einen Vergleich mit Trennungen von Testlösungen berechnet.

4. Tryptophan- und Tyrosinbestimmungen (nach Bencze und Schmidt, 84).

a. Ermittlung des Referenzwertes S.

Es wurden die Extinktionen verschiedener Proben von Tyr und Trp bekannter molarer Mischungsverhältnisse, gelöst in 0,1 N NaOH, zwischen 280 mμ und 294 mμ in 2 mμ Intervallen gemessen (Beckmann DU). Für jede Probe wurde eine Extinktionskurve gezeichnet. An die beiden Extinktionsmaxima wurde eine Tangente angelegt, die die Hypotenuse eines zu konstruierenden Dreiecks darstellte, mit der Kathete a, der



eine unabhängig variable Extinktionsdifferenz ΔE zukommt und der Kathete b, mit der abhängig variablen Wellenlängendifferenz $\Delta m\mu$ (siehe Skizze Seite 16). Der Referenzwert S eines bestimmten molaren Mischungsverhältnisses beider Aminosäuren errechnet sich nach folgender Gleichung:

$$S = \frac{a \,/\, b}{E_{max}} = \frac{\Delta E \times 10^3 \,/\, \Delta m\mu}{E_{max}} \qquad \begin{matrix} (\, a = \Delta E \times 10^3 \,) \\ (\, b = \Delta m\mu \,) \end{matrix}$$

b. Bestimmung von Tyrosin und Tryptophan.

Der Tyr und Trp Gehalt einer Proteinprobe wurde nach Bestimmung ihres Mischungsverhältnisses und ihrer Gesamtmenge berechnet. Zuerst wurde der Referenzwert S ermittelt und, im Vergleich mit den Referenzwerten der Eichlösungen, das Mischungsverhältnis der beiden Aminosäuren. Ihr Gesamtgehalt ergab sich durch Division der maximalen Extinktion der Probe durch einen Extinktionskoeffizienten, der vorher bei der Eichlösung gleichen Mischungsverhältnisses bestimmt worden war. Nachdem sich diese Bestimmungsmethode gut bewährt hatte, wurde der Trp Gehalt bestimmt, indem nach Berechnung der Größe S, der in den Aminosäureanalysen an Ionenaustauschersäulen erhaltene Tyr-Wert herangezogen wurde.

5. Sulfitolyse (nach Henschen, 24).

a. Spaltung.

Zu 75 ml einer 1% Proteinlösung, die fortwährend durch einen Magnetrührer gemischt wurde, wurden 14 ml einer gesättigten Na_2SO_3-Lösung gegeben. Durch Zugabe von Ammoniak wurde dafür gesorgt, daß das pH nicht unter 8 absank. Zu dieser Lösung wurden 5 ml 1 M $CuSO_4$-Lösung in 0,5 ml Portionen immer dann gegeben, wenn der entstandene Niederschlag sich aufgelöst hatte. Mit 4 N HCl wurde das pH auf 8,3 gehalten. Nach Beendigung der Reagenzienzugabe wurde noch eine Stunde unter pH-Kontrolle, pH = 9,0, weiter gerührt.

b. Dialyse.

Die resultierende Lösung wurde in Visking Schläuchen

nacheinander je 12 Stunden gegen je 2 L von 5 verschiedenen Lösungen dialysiert:
1. 0,0 M EDTA, 0,01 N HCl, 2. und 3. 0,005 M EDTA, 0,005 N HCl, 4. und 5. Aqua dest. Alle Lösungen waren mit konz. NH_3 auf pH = 9,0 eingestellt worden. Die Proteinlösungen wurden nach Dialyse in Portionen aufgeteilt und bei -20°C aufbewahrt.

6. Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose.

a. Vorbereitung der Cellulose.

Die Cellulose (CM-32, microgranular, Fa. Whatman, Herst.: W. u.R. Balstone, Maidstone, England) wurde in 15 Volumina (w/v) 0,5 N NaOH eingerührt. Nach 30 Minuten wurde auf einer Porzellanfritte abgenutscht und mit Wasser solange nachgespült, bis pH = 8,0 erreicht war (pH-Papier). Eine gleichartige Behandlung mit 0,5 N HCl schloß sich an. Anschließend wurde mit Wasser gewaschen, bis der Durchlauf annähernd neutral geworden war.
Diese vorgequollene Cellulose wurde in Startpuffer suspendiert und in einer Saugflasche über einem Magnetrührer im Wasserstrahlvakuum entgast. Zwecks Entfernung von feinen Cellulosebruchstücken wurde die Suspension in einem 1L Meßzylinder eingefüllt. Nach 20 - 30-minütigem Sedimentieren wurden die "fines" abdekantiert. Der Sedimentationsvorgang wurde 1 - 2 mal wiederholt, bis sich schon kurz nach Sedimentationsbeginn eine scharfe Grenze zwischen Suspension und dem jetzt klaren Überstand zeigte.

b. Füllen der Säule und Äquilibrieren.

Die sedimentierte Cellulose wurde vorsichtig mit Startpuffer zu einem dicken Brei angerührt, der gerade gut fließbar war und unter Vermeidung des Einschlusses von Luftblasen in eine Trennsäule - 25 x 420 mm - mit verstellbaren Adaptern eingefüllt (Fa. Pharmacia, Frankfurt). Durch Drücken auf den oberen Adapter, bei dessen abgesperrten Puf-ferzulauf, wurde das Volumen der Suspension gleichmäßig schnell eingeengt, so daß der Puffer durch den unteren Adapter mit geöffnetem

Auslauf mit der doppelten Fließgeschwindigkeit auslief, wie sie später bei der Chromatographie verwendet wurde. Hatte die Betthöhe einen konstanten Wert erreicht - max. 200 mm - wurde der obere Adapter leicht an die Bettoberfläche gedrückt und arretiert. Durch den oberen Zulauf wurden 2L Limitpuffer mit normaler Elutionsgeschwindigkeit gepumpt - 80 ml / Std - und dann wieder Startpuffer, bis die Cellulose vollkommen äquilibriert war (Prüfung des pH vom Eluat mit Glaselektrode).

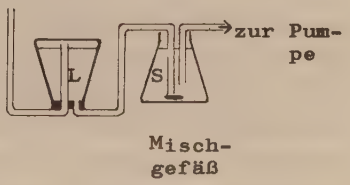
c. Trennung der Proteine.

Die Proteinlösung, enthaltend bis zu 100 mg Protein, wurde nach erschöpfender Dialyse gegen Startpuffer auf die Säule aufgetragen. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 80 ml / Std, der Gradient war in der Regel linear.

Skizze von Geräten zur Erzeugung eines bestimmten Gradienten.

1. Gradient linear

2. Gradient konvex



L = Limitpuffer, S = Startpuffer.

Das Eluat wurde im Uvicord (Fa. LKB-Produkter, Stockholm, Schweden) in einer Durchlaufkuvette bei 281 mμ gemessen, seine Extinktionen durch einen Schreiber (LKB) automatisch registriert und mit dem Ultro-Rac (LKB) in Fraktionen von 10 ml aufgeteilt.

Startpuffer: 500 ml 0,005 M NaAcetat, 6 M Harnstoff, pH = 5,3,
Limitpuffer: 500 ml 0,1 M NaAcetat, 6 M Harnstoff, pH = 5,3.

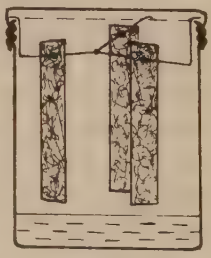
7. N-terminale Aminosäureanalyse (Edman Abbau mit der Mikromethode nach Schroeder, 91).

a. Vorbereitung der Proteinproben und Auftrag.

Wurden Proteine analysiert, die sich in geringer Konzentration in Lösung befanden, etwa die chromatographisch isolierten S-sulf-Derivate, wurden deren Lösungen durch Filtration in Ultrahülsen (Fa. Sartorius, Göttingen) unter Wasserstrahlvakuum auf ca. 5% Lösungen eingeengt. Es wurde mehrmals mit 3 M Harnstofflösungen nachgespült, um einerseits die Salze zu entfernen und andererseits die Proteine in Lösung zu halten. Die eingeengten Lösungen wurden auf kleine Streifen - 9 x 70 mm - Elektrophoresepapier (Schleicher Schüll Nr. 2043) appliziert. Pro Protein wurden ca. 0,5 µMol gebraucht. Insgesamt wurden 0,15 ml pro Streifen aufgetragen. Nötigenfalls wurde die benötigte Lösungsmenge auf mehrere Streifen verteilt; über Nacht wurden sie getrocknet.

b. Reaktion mit Phenylisothiocyanat (PITC).

Je drei Papierstreifen wurden auf ein Gestell aus korrosionsfreiem Draht gehängt und dann mit einer 20% Lösung von PITC in Dioxan vollkommen benetzt, ohne daß etwas von dem Reagens vom Streifen abtropfte. Das Gestell mit den drei Streifen wurde so auf den Rand eines 250 ml Schraubdeckelglases gelegt, daß die Streifen frei im Raum hingen, also keinen Kontakt zur Glaswand hatten und auch nicht zu dem am Grunde des Glases befindlichen Gemisch aus je 5 ml Dioxan, Pyridin und Wasser (siehe Skizze nebenan). Das Glas wurde vorsichtig verschlossen und für 3 Stunden im Trockenschrank auf 40°C erhitzt.



c. Extraktion der Reagenzien.

Die Streifen wurden am Gestell hängend aus der Reaktionsatmosphäre herausgenommen und etwas angetrocknet, bis die Transluzens gerade im Begriff war zu verschwinden. Sofort

wurde das Gestell auf den Rand eines, dem obigen identischen Glases gelegt, das voll mit Benzol gefüllt war, in welches die Streifen zwecks Extraktion der Reagenzien hineinhingen. Nach je 1,5 Stunden wurde das Benzolbad zweimal erneuert. Im dritten Bad verblieben die Streifen über Nacht.

d. Zyklisierung und Abspaltung der PTH-Aminosäuren.

Nach der Extraktion wurden die Streifen für 1 Stunde getrocknet und an ein Glasgestell gehängt, das in einen Exsiccator gestellt werden konnte. In Gegenwart von 15 ml Eisessig und 15 ml 6 N HCl in zwei verschiedenen Bechergläsern wurde die Reaktion für 7 Stunden bei einem reduzierten Druck von 100 Torr durchgeführt. Danach wurden die Streifen zur Entfernung der Säuren über Nacht gelüftet.

e. Extraktion der PTH-Aminosäuren.

Die PTH-Aminosäuren wurden aus den vollkommen trockenen Streifen durch zwei 2-stündige Behandlungen mit Aceton in dickwandigen Reagenzgläsern mit Schliffstopfen - 15 x 120 mm - extrahiert (das Restprotein blieb auf den Papierstreifen adsorbiert zurück und kann gegebenenfalls weiteren Abbauschritten unterzogen werden). Am Rotationsverdampfer wurden die in Eiswasser gekühlten Proben vorsichtig zur Trockne eingeengt.

f. Identifikation der PTH-Aminosäuren.

Die Proben mit den PTH-Aminosäuren wurden in wenig Aceton aufgenommen und auf 20 x 20 cm große Dünnschichtplatten übertragen, die mit Kieselgel, das einen Fluoreszenzindikator enthielt, beschichtet waren (DC-Fertigplatten-Kieselgel F-254, Merck, Darmstadt). Eine Chromatographiekammer - 200 x 200 x 60 mm - wurde mit 150 ml eines Gemisches aus Chloroform und Methanol (9 : 1) als mobile Phase beschickt und mit einem Deckel verschlossen. Nach einer halben Stunde wurde die Dünnschichtplatte in die Kammer gestellt. Der Lauf erfolgte aufsteigend; hatte die Front eine Laufstrecke von 100 mm zurückgelegt, wurde der Lauf abgebrochen und die

Platte unter einem Föhn schnell getrocknet. Die PTH-Aminosäuren erschienen im UV-Licht als dunkle Flecken. PTH-Glycin und PTH-Tyrosin wurden außerdem dadurch sichtbar gemacht, daß die angefeuchtete Platte über konz. Ammoniak gehalten wurde. Dabei färbte sich PTH-Glycin rot und PTH-Tyrosin kräftig gelb.

8. Hexosenbestimmung.

a. Anthronreaktion (nach Yemm und Willis, 94).

Die Reagenzgläser mit je 1 ml Proteinlösung, enthaltend 5 - 200γ Zucker, wurden im Eisbad vorgekühlt. Nach Durchmischen der Proben mit Anthronreagens verblieben sie noch weitere 5 Minuten im Eisbad. Daran schloß sich für 10 Minuten eine Hitzebehandlung bei 95°C im Wasserbad an.

b. Auswertung (nach Gollwitzer, 47).

Die abgekühlten Proben wurden im Spektralphotometer Beckmann DU bei 525 mµ, 585 mµ (Extinktionnunabhängig vom Tryptophan Gehalt), 625 µ und 720 mµ (Nullwert) gemessen.

Anthronreagens: 0,2 g Anthron in 100 ml verdünnter Schwefelsäure lösen; frühestens 40 Min vor Versuch ansetzen.
Verd. H_2SO_4: 200 ml Wasser + 500 ml konz. H_2SO_4 (ϱ = 1,84).

9. Disk-Elektrophorese.

Die Disk-Elektrophorese wurde in einer Apparatur von Pleuger Nijnegem, Belgien) durchgeführt, die bis zu acht Gelröhrchen faßte.
In die Röhrchen (Innendurchmesser = 0,6 mm) wurde eine Trenngellösung bestimmter Konzentration bis zu einer Höhe von 55 mm eingefüllt und vorsichtig mit Wasser aus einer Injektionsspritze überschichtet. Die Polymerisation erfolgte bei Tageslicht. Nach ca. 45 Minuten wurde der flüssige Überstand abgeschleudert. Das freie Röhrchenlumen über dem Trenngel wurde mit Laufpuffer ausgespült und mit Kleenex getrocknet, bevor die Sammelgellösung von 3 mm Höhe einpipettiert wurde. Polymerisiert wurde 2 Stunden im UV-Licht. Danach wurden die

Röhrchen innen, über dem Gel, wie oben gereinigt und mit einer Proteinlösung beschickt, die durchschnittlich 50γ Protein enthielt. Das Lösungsvolumen betrug im allgemeinen 0,1 ml, maximal 0,2 ml.

Diese, im Vergleich zu Literaturangaben sehr hohe Flüssigkeitsmenge hatte keine störende Verbreiterung der Banden zur Folge. Sie war dann von Vorteil, wenn die Oberfläche eines Geles nicht ganz eben war, was manchmal bei Sammelgelen vorkam; vermutlich wegen der starken und ungleichmäßigen Wärmeentwicklung durch die UV-Lampe während des Polymerisationsschrittes. Bei den üblich geringen Auftragsmengen würde sich die Proteinlösung zu einem erheblichen Teil in einer Mulde oben auf dem Sammelgel ansammeln, so daß keine gleichmäßigen Banden entstehen können.

Nach dem Proteinauftrag wurden die Röhrchen in die Trennapparatur eingebracht und mit Laufpuffer aufgefüllt (Spritze). Die Trennungen erfolgten bei unterschiedlichem pH, bei denen natives Fibrinogen aber noch eine relativ große Stabilität aufwies. Im sauren Bereich fand als Kammerpuffer eine ß-Alaninlösung, im alkalischen ein Glycin-Tris-Puffer Verwendung. Pro Röhrchen wurde ein Stromdurchfluß von 4 mA eingehalten. Der Lauf wurde im Kühlraum durchgeführt (6°C), um unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten infolge nicht abgeleiteter Joul'scher Wärme zu vermeiden. Nach Beendigung des Laufes wurden die Gele mit Wasser aus einer langkanüligen Injektionsspritze aus den Röhrchen ausgeschwemmt - und das möglichst schnell, um eine Verbreiterung der Banden durch Diffusion zu vermeiden - und sofort in ein Fixier- und Färbebad eingelegt, enthaltend 7 % Amidoschwarz in 7 % Essigsäure. Nach 15 Minuten wurden die Gele in 7 % Essigsäure entfärbt.

Alle Gel- und Proteinlösungen waren 6 M an Harnstoff, dessen Gegenwart die Vernetzung der Proteine über Wasserstoffbrükken verhinderte.

Lösungen für Läufe bei pH = 9,2 (Abkürzungen siehe unten).

Laufpuffer: Tris : 6,0 g
Glycin : 28,8 g
} mit Wasser auf 100 ml auffüllen, pH = 8,3

Standardlösungen für Trenngele

1. Puffer: 1 N HCl : 48,0 ml
Tris : 36,6 g
Temed : 0,23 ml
} auf 100 ml, pH = 8,9

2. Gel: Acrylamid : 30,0 g
Bis : 0,8 g
Harnstoff : 18,2 g
} auf 100 ml, Harnstoff = 3 M (Lagerung: kühl, dunkel)

3. Per : 0,14 g
Harnstoff : 54,05 g
} auf 100 ml, Harnstoff = 9 M (jedesmal neu ansetzen)

Standardlösungen für Sammelgele

4. Puffer: 1M H_3PO_4 : 25,6 ml
Tris : 5,7 g
Harnstoff : 36,04 g
} auf 100 ml, Harnstoff = 6 M, pH = 6,9

5. Gel: Acrylamid : 10,0 g
Bis : 2,5 g
Harnstoff : 36,04 g
} auf 100 ml, Harnstoff = 6 M, (Lagerung: kühl und dunkel)

6. Riboflavin : 4,0 g
Harnstoff : 36,04 g
} auf 100 ml, Harnstoff = 6 M (Lagerung: dunkel).

Bereitung der Gele:

a. Trenngel (fein, 7,5 %): 2 ml Puffer (Lösung 1)
4 ml Gel (" 2)
2 ml 6 M Harnstoff
8 ml Per (" 3)

b. Sammelgel (grob, 2,5 %): 1 ml Puffer (Lösung 4)
2 ml Gel (" 5)
4 ml 6 M Harnstoff
1 ml Riboflavin (" 6)

Abkürzungen:

Tris = Tris(hydroxomethyl)aminoäthan

Temed = N,N,N',N'-Methylenbisacrylamid

Per = Ammoniumperoxidisulfat.

10. Präparation von Cu-I-Fibrinogen.

10 ml einer 1,5 %igen Fibrinogenlösung wurden mit 15 ml Kupferäthylendiaminlösung versetzt. Nach 4 Std. wurde das Reaktionsgemisch mit konz. Salzsäure auf pH = 9,0 zurückgestellt und in Visking Schläuchen dialysiert.

Dialysebäder: 6 M Harnstofflösung, pH = 9,0; wurde mehrmals gewechselt, bis Dialysebad farblos blieb. Die folgenden 5 Dialysebäder enthielten ebenfalls 6 M Harnstoff und zusätzlich EDTA und HCl in abnehmenden Konzentrationen wie die vergleichbaren Dialysebäder nach der Sulfitolyse (Siehe Versuch 5, Seite 77). Die dialysierte Cu-I-Fibrinogen-Lösung wurde in Portionen zu maximal 10 ml aufgeteilt und bei -20°C aufbewahrt. Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben durch Filtration in Ultrahülsen (Fa. Sartorius) unter Wasserstrahlvakuum eingeengt.

Kupferäthylendiaminlösung: 1,5 g Kupferhydroxid mit 6 g Äthylendiamin versetzen und unter Kühlung mit Wasser auf 45 ml auffüllen. Zentrifugieren, um eventuell gebildetes Kupferoxid abzutrennen.

11. Gelfiltration an Sephadex G-200.

Sephadex G-200 wurde 3 Tage lang in 6 M Harnstofflösung, 0,3 M NaCl, vorgequollen. Auf eine Chromatographiesäule - 2,5 x 100 cm - (Fa. Pharmacia, Frankfurt) wurde eine zweite gleichartige Säule - 2,5 x 60 cm -, unter Zwischenlegen eines Dichtungsringes, fest aufgepreßt. Die Sephadexsuspension wurde vorsichtig in die Doppelsäule eingefüllt und bis zur vollständigen Sedimentation stehen gelassen. Dann wurde die aufgesetzte Säule nach Abhebern des in ihr stehenden Puffers abgenommen. Es wurde aufsteigend chromatographiert bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 10 ml pro Stunde. Das Eluat wurde im UV-Licht auf den Proteingehalt überprüft und in Fraktionen von 10 ml aufgeteilt (siehe Versuch 6, Seite 79).

12. Glucosaminbestimmung (nach Balazs et al., 95).

Die Bestimmung des Glucosamin Gehaltes nach der automatisierten Methode von Balazs et al. wurde im Technicon Auto-Analyser durchgeführt (Fa. Technicon, USA, Niederl. Frankfurt). Nach Acetylierung des Aminozuckers erfolgte mit Zugabe von Ehrlich Reagens eine Farbentwicklung. Diese wurde im UV-Licht bei 530 mμ ausgewertet.

13. SDS-Disk-Elektrophorese (nach Weber und Osborn, 103).

Es wurde die gleiche Apparatur wie bei der normalen Disk-Elektrophorese verwendet (siehe Versuch 9, Seite 82).

a. Präparation der Proteinlösung.

Ungefähr 5 mg Protein wurden für zwei Stunden bei 36°C mit 1 ml einer Lösung nachfolgender Zusammensetzung inkubiert: 0,01 M Natriumphosphat, pH = 7,0, 8 M Harnstoff, 1 % Merkaptoäthanol, 1 % SDS. Danach wurde einige Stunden bei Zimmertemperatur gegen folgende Lösung mit einmaligem Badwechsel dialysiert: 0,01 M Natriumphosphat, pH = 7,0, 1 % Merkaptoäthanol, 1 % SDS.

b. Gelbereitung.

Zu 15 ml Gelpuffer wurden 13,5 ml Acrylamidlösung, 1,5 ml frisch bereitete 1,5% Ammoniumperoxidisulfatlösung und 0,045 ml N,N,N',N'-Tetramethylendiamin gegeben. Je 1,5 ml dieses Gemisches wurden in ein Gelröhrchen einpipettiert und vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach etwa 40 Min. Stehenlassen war das Gel fertig auspolymerisiert.

Gelpuffer :	7,8 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 38,6 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 2,0 g SDS	mit Wasser auf 1L auffüllen
Gellösung :	22,2 g Acrylamid 0,6 g Bis	mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

c. Probenauftrag und Trennlauf.

0,1 ml Proteinlösung wurden mit 0,05 ml der Lösung folgender Zusammensetzung versetzt: 0,3 ml einer 0,05% Bromphenolblaulösung in Wasser, 0,5 ml Merkaptoäthanol, 5 ml Dialysepuffer und 10 Tropfen Glycerin. Nachdem das Wasser aus den Gelröhrchen entfernt war, wurden die Proteinproben eingefüllt und die Gelröhrchen mit Gelpuffer aufgefüllt, der 1 : 1 mit Wasser verdünnt war. Derselbe verdünnte Puffer diente als Kammerpuffer. Der Lauf ging von minus (oben) nach plus (unten). Während der 16 stündigen Laufdauer floß ein Strom von 4 mA durch jedes Gel. Die Weiterbehandlung der Gele nach dem Lauf wurde wie bei Versuch 9 vorgenommen (siehe Seite 83).

F. Zusammenfassung.

1. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden präparative und analytische Methoden überprüft oder neu entwickelt, um Rinderfibrinogen rein darzustellen, zu charakterisieren und in seinem molekularbiologischen Aufbau zu untersuchen.

a. Um hochgereinigtes Fibrinogen zu erhalten, wurde es mit Glycin aus Plasma niedergeschlagen und durch fraktionierte Alkoholfällung weiter gereinigt. Vom erhaltenen Material wurden die Aminosäurenzusammensetzung, die Aminoendgruppen und der Gehalt an Hexosen und Aminozuckern bestimmt.

b. Fibrinogen und Fibrinmonomere wurden durch Spaltung ihrer Disulfidbindungen mittels Sulfit in 8 M Harnstoff in die einzelnen Peptidketten zerlegt. Für die präparative Trennung der Einzelketten erwies sich Chromatographie an CM-Cellulose in Gegenwart von 8 M Harnstoff als am besten geeignet. Zur Elution diente Acetatpuffer pH 5,3 mit einem linear ansteigenden Na-Acetat-Gradienten. Die erhaltenen Peptidketten wurden durch Bestimmung ihrer Aminoendgruppen charakterisiert. Die Trennbilder von sulfitolysiertem Fibrinogen und Fibrin unterschieden sich deutlich.

c. Zur analytischen Trennung der Peptidketten des Fibrinogens und des Fibrins wurde ein elektrophoretisches Verfahren an Polyacrylamidgel neu ausgearbeitet, in dem erstmals eine elektrophoretische Trennung aller drei Peptidketten gelang. Die aus einem Sulfitolysat erhaltenen Banden wurden durch Vergleich ihrer Wanderungsgeschwindigkeit mit den von chromatographisch gereinigten Fraktionen zugeordnet.

d. Von den einzelnen Peptidketten des Fibrinogens wurde der Kohlenhydratgehalt bestimmt. Während Glucosamin in allen drei Ketten etwa gleich stark vertreten ist, enthält eine γ-Kette mit 3,23% etwa doppelt soviel Glucose wie eine α(A)- (0,79%) und eine ß(B)-Kette (0,69%) zusammen.

2. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die oben ausgearbeiteten

Methoden dazu verwendet, die Veränderungen zu untersuchen, die Fibrinogen bei Einwirkung von Kupferäthylendiamin (CuÄDA) erleidet. Dabei entstanden zwei Fraktionen, von denen die erste weitgehend einheitlich war und den größten Teil des Fibrinogens darstellte, während die zweite aus einem Gemisch von Abbaupeptiden bestand.

a. Für die Darstellung der Hauptfraktion (Cu-I-Fibrinogen) wurde das Verfahren abgeändert, wobei eine Ausfällung vermieden wurde, um die Bildung unlöslicher Aggregate zu verhindern. Die Fraktion wurde durch Gelfiltration an Sephadex G-200 von den Peptiden abgetrennt.

b. Die Aminosäurenzusammensetzung von Cu-I-Fibrinogen wies gegenüber der des Fibrinogens begrenzte aber charakteristische Veränderungen auf: Eine deutliche Abnahme von Prolin und Glycin deutete darauf hin, daß nichthelicale Bereiche des Fibrinogens bevorzugt angegriffen worden waren. Bei den Zuckern war eine relative Zunahme der Hexosen nachweisbar.

c. Bei Sulfitolyse zerfiel Cu-I-Fibrinogen in drei Fraktionen, die sowohl chromatographisch als auch elektrophoretisch aufgetrennt werden konnten. Die Fraktionen verhielten sich ähnlich wie die drei Peptidketten von sulfitolysiertem Fibrinogen. Offensichtlich handelt es sich um Abkömmlinge dieser Ketten. Das Derivat der α(A)-Ketten war nur in vergleichsweise geringer Menge nachweisbar.

d. Die Molekulargewichte der drei Fraktionen von sulfitolysiertem Cu-I-Fibrinogen wurden mit Hilfe der SDS-Diskelektrophorese bestimmt. Das Derivat der ß(B)-Kette (MG 59.000) wies gegenüber dem ursprünglichen Produkt nur ein geringfügig vermindertes Mol-Gewicht auf. Der Abkömmling der γ-Ketten spaltete in zwei Anteile auf, von denen der größere (MG 49.000) nur wenig, der zweite (MG 36.000) etwas stärker von der Stammkette unterschieden war. Von den α(A)-Ketten hingegen war nur ein längeres Peptid vom Mol-Gewicht 22000 - 26000 zurückgeblieben. Aus diesen Werten wurde das Mol-Gewicht von Cu-I-Fibrinogen auf mindestens

250.000 geschätzt. Das wären 70% des Molgewichtes von Fibrinogen.

e. Das Ergebnis eines Abbaues von Fibrinogen durch CuÄDA ist, daß etwa 1/4 des Moleküls abgespalten wird, wobei ein Core-Protein (Cu-I-Fibrinogen) zurückbleibt, das im wesentlichen noch den dreikettigen Molekülaufbau aufweist. Auffallend dabei ist der starke Abbau der α(A)-Ketten, der vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß diese Ketten durch helicale Abschnitte nur verhältnismäßig wenig stabilisiert sind. Analog zu diesem Befund ist in neuester Zeit ein Begleiter von Fibrinogen aus Blut isoliert worden, dem die α(A)-Kette fehlt. Auch bei Plasminabbau des Fibrinogens in vitro werden die α(A)-Ketten am stärksten abgebaut.

a. α(A)-Kette (N-terminal):

A-Peptid ⟶

1 16
Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg - α-Kette ⟶ Gly-Pro-Arg-Val-

-Val-Glu-Arg-His-Gln-Ser-Ala-Cys-Lys-Asp-Ser-Asp-Trp-Pro-Phe(Asp,Asp,Cys,Glu,Trp,

,Tyr,Ser)Lys-Cys-Pro-Ser-Gly-Cys-Arg-Met- - - (Blombäck, 113).
50

b. ß(B)-Kette (N-terminal):

B-Peptid ⟶

1 14
Pyr-Gly-Val-Asn-Asp-Asn-Glu-Glu-Gly-Phe-Phe-Ser-Ala-Arg - ß-Kette ⟶ Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-

21
-Lys- - - (Iwanaga et al., 33).

c. γ-Kette (N-terminal):

1
Tyr-Val-Ala-Thr-Arg-Asp-Asn-Cys-Cys-Ile-Leu-Asp-Glu-Arg-Phe-Gly-Ser-Tyr-Cys-Pro-

-Thr-Thr-Cys-Gly-Ile-Ala-Asp-Phe-Leu-Ser-Thr-Tyr-Gln-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Asp-Leu-

-Gln-Ser-Leu-Glu-Asp-Ile-Leu-His-Gln-Val-Glu(Asn)Lys-Thr-Ser-Glu-Val-Lys-Gln-Leu-

-Ile-Lys-Ala-Ile-Gln-Leu-Thr-Tyr-Asn-Pro-Asp-Glu-Ser(Asp,Lys,Pro)Met- - -
78

(Iwanaga et al., 34).

d. γ-Kette (C-terminal):

1
-Leu-Thr-Ile-Gly-Glu-Gly-Gln-Gln-His-His(Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Glx-Ala-Gly-Asx)-

20
-Val-COOH (Vernetzung mit einer zweiten γ-Kette) ⟶ - - -Gln- - -

(Chen et al., 114).

H. Literaturverzeichnis.

1) Wuhrmann,F. Wunderly,C.,
Bluteiweißkörper des Menschen, Schwabe & Co. Basel,Stuttgart (1957)

2) Cohn,E.J. Strong,L.E. Hughes Jr.,W.L. Mulford,D.J. Ahsworth,J.N. Melin,M. Taylor,H.L.,
J. Am. Chem. Soc., 68, 459 (1946).

3) Heimburger,N. Trobisch,H.,
Angew. Chemie, 83, 89 (1971).

4) Quick,A.J.,
Thrombos. Diathes. Haemorrh. Suppl. 13, 73 (1966).

5) Pawlowsky,A.,
Transact. Conf. Int. Comm. Blood Clotting Factors, Gleneagles (1963).

6) Seegers,W.H. Marciniak,E. Heene,D.,
Texas Reports Biol. Med., 23, 675 (1965).

7) Kowarzyk,H. Marciniak,E.,
Proc. 8th Congress Europ. Soc. Haematol., Wien, 402pp, (1961).

8) Seegers,W.H.,
Minnesota Medicine, 49, 171 (1966).

9) Barnhart,M.J. Anderson,G.F.,
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 110, 734 (1962).

10) Gittin,D. Landing,B.H. Whipple,A.,
J. Exptl. Med., 97, 163 (1953).

11) Hammond,J.D.S. Verel,D.,
Brit. J. Haematol., 5, 431 (1959).

12) Hall,C.E. Slayter,H.S.,
J. Biochem. Biophys. Cytol., 5, 11 (1959).

13) Siegel,B.M. Mernan,J.P. Scheraga,H.A.,
Biochim. Biophys. Acta, 11, 329 (1953).

14) Bang,U.,
Thrombos. Diathes. Haemorrh., Suppl. 13, 73 (1963).

15) Köppel,G.,
Z. Zellforsch., 77, 443 (1967).

16) Karges,H.E.,
Dissertation, Heidelberg (1969).

17) Okude,M. Iwanaga,S.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 41, 450 (1970).

18) Chen,R. Doolittle,R.F.,
Proc. Natl. Acad. Sci., 66, 472 (1970).

19) Kasai,K-i. Yokoyama,Sh. Ishii,Sh-i.,
FEBS Letters, 11, 298 (1970).

20) Blombäck,B. Yamashina,I.,
Arkiv Kemi, 12, 299 (1957).

21) Laki,K. Gladner,J.A. Folk,J.E.,
Nature, 187, 758 (1960).

22) Clegg,J.B. Bailey,K.,
Biochim. Biophys. Acta, 63, 525 (1962).

23) Henschen,A.,
Arkiv Kemi, 22, 397 (1964).

24) Henschen,A.,
Arkiv Kemi, 22, 1 (1963).

25) Henschen,A.,
Arkiv Kemi, 22, 375 (1964).

26) Johnson,P. Mihalyi,E.,
Biochim. Biophys. Acta, 102, 467 (1965).

27) McKee,P.A. Rogers,L.A. Marler,E. Hill,R.L.,
Arch. Biochem. Biophys., 116, 271 (1966).

28) Folk,J.E. Gladner,J.A. Levin,Y.,
J. Biol. Chem., 234, 2317 (1959).

29) Blombäck,B. Sjöquist,J.,
Acta Chem. Scand., 14, 493 (1960).

30) Blombäck,B. Doolittle,R.F. Blombäck,M.,
Prot. Biol. Fluids, ed. H.Peeters, Section A 87pp (1964).

31) Blombäck,B. Blombäck,M. Gröndahl,N.J. Holmberg,E.,
Arkiv Kemi, 25, 411 (1966).

32) Doolittle,R.F. Schubert,D. Schwartz,S.A.,
Arch. Biochem. Biophys., 118, 456 (1967).

33) Iwanaga,S. Wallén,P. Gröndahl,N.J. Henschen,A.
Blombäck,B.,
Biochim. Biophys. Acta, 147, 606 (1967).

34) Iwanaga,S. Blombäck,B. Gröndahl,N.J. Hessel,B.
Wallén,P.,
Biochim. Biophys. Acta, 160, 280 (1968).

35) Blombäck,B. Blombäck,M. Hessel,B. Iwanaga,S.,
Nature, 215, 1445 (1967).

36) Blombäck,B. Blombäck,M. Henschen,A. Hessel,B.
Iwanaga,S. Woods,K.R.,
Nature, 218, 130 (1968).

37) Henschen,A.,
Arkiv Kemi, 22, 355 (1964).

38) Consden,R. Stanier,W.M.,
Nature, 169, 783 (1952).

39) Blombäck,B.,
Arkiv Kemi, 12, 321 (1958).

40) Szára,S. Badgy,D.,
Biochim. Biophys. Acta, 11, 313 (1953).

41) Stary,Z. Bursa,F. Anhegger-Lisie,S.G.,
Z. physiol. Chem., 295, 29 (1953).

42) Böhm,P. Baumeister,L.,
Klin. Wochenschr., 33, 712 (1955).

43) Hörmann,H. Gollwitzer,R.,
Z. Physiol. Chem., 346, 21 (1966).

44) Mester,L. Moczar,E.,
C.R. Acad. Sci., 260, 2617 (1965).

45) Chandresakhar,N. Warren,L. Osbahr,A.J. Laki,K.,
Biochim. Biophys. Acta, 63, 337 (1962).

46) Tyler,H.M.,
Nature, 210, 1045 (1966).

47) Gollwitzer,R.,
Dissertation, München (1965).

48) Mester,L. Moczar,E. Vas,G. Szabados,L.,
C.R. Acad. Sci., 260, 2342 (1965).

49) Haschemeyer,R.H. Cynkin,M.A. Han,L-C. Trindle,M.,
Biochemistry, 5, 3443 (1966).

50) Mills,D.A. Liener,I.E.,
Arch. Biochem. Biophys., 130, 629 (1969).

51) Lorand,L.,
Biochem. J., 52, 200 (1952).

52) Haschemeyer,A.E.V. Tinoco,I.,
Biochemistry, 1, 996 (1962).

53) Shulman,S. Ferry,J.D.J.,
Phys. Colloid. Chem., 54, 66 (1950).

54) Laki,K. Mihalyi,E.,
Nature, 163, 66 (1954).

55) Pisano,J.J. Finlayson,J.S. Payton,M.P.,
Science, 160, 892 (1968).

56) Chen,R. Doolittle,R.F.,
Proc. Nat. Acad. Sci., 63, 420 (1969).

57) Takagi,T. Iwanaga,S.,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 38, 129 (1970).

58) Wagner,H.J.,
Diplomarbeit, Frankfurt (1970).

59) Lorand,L. Chenoweth.D. Domanik,R.A.,
Biochim. Biophys. Res. Comm., 37, 219 (1969).

60) McDonagh,R.P. McDonagh,J. Blombäck,M. Blombäck,B.,
Febs Letters, 14, 33 (1971).

61) Gollwitzer,R. Karges,H.E. Hörmann,H. Kühn,K.,
Biochim. Biophys. Acta, 207, 445 (1970).

62) Cohen,C. Revel,J-P. Kucera,J.,
Science, 141, 436 (1963).

63) Bang,U.,
Thrombos. Diathes. Haemorrh., Suppl. 13, 73 (1963).

64) Kay,D. Cuddigan,B.J.,
Brit. J. Haematol., 13, 341 (1967).

65) Iatridis,S.G. Ferguson,J.H.,
Thrombos. Diathes. Haemorrh., 6, 411 (1961).

66) Fearnley,G.R. Tweed,J.M.,
Clin. Sci., 12, 81 (1953).

67) Triantaphyllopoulos,E. Triantaphyllopoulos,D.C.,
Life Sci., 7, 431 (1968).

68) Budziński,A.Z. Stahl,M. Kopéc,M. Latałło,Z.S.
Wegrzynowicz,Z.,
Biochim. Biophys. Acta, 147, 313 (1967).

69) Marder,V.J. Shulman,N.R.,
J. Biol. Cem., 244, 2111 (1969).

70) Nüssenzweig,V. Seligmann,M. Pelmont,J. Graber,P.,
Ann. Inst. Pasteur, 100, 377 (1961).

71) Gormsen,J. Laursen,B.,
Thrombos. Diathes. Haemorrh., 17, 467 (1967).

72) Rickli,E.E.,
Chimia, 20, 73 (1966).

73) Mihalyi,E. Godfrey,J.E.,
Biochim. Biophys. Acta, 67, 73 + 90 (1963).

74) Mihalyi,E. Godfrey,J.E.,
Biochim. Biophys. Acta, 132, 94 (1967).

75) Schauenstein,E. Hochenegger,M.,
Polymer. Sci., 10, 63 (1953).

76) Schauenstein,E. Hochenegger,M.,
Z. Naturforschung, 8b, 473 (1953).

77) Klingenberg,H.G. Schauenstein,E.,
Z. Naturforschung, 8b, 488 (1953).

78) Budziński,A.Z. Stahl,M.,
Biochim. Biophys. Acta, 175, 282 (1969).

79) Blombäck,B. Blombäck,M.,
Arkiv Kemi, 10, 415 (1956).

80) Mosseson,M.W. Sherry,S.,
Biochemistry, 5, 2829 (1966).

81) Bosch van der,J.,
Diplomarbeit, München (1969).

82) Strauch,L.,
Z. klin. Chem., 3, 165 (1965).

83) Moore,S. Stein,W.H.,
J. Biol. Chem., 176, 367 (1954).

84) Bencze,W.L. Schmidt,K.,
Anal. Chem., 29, 1193 (1957).

85) Pechère,J.F. Dixon,G.H. Maybury,R.H. Neurath,H.,
J. Biol. Chem., 233, 1364 (1958).

86) Cartwright,T. Kekwick,G.O.,
Biochim. Biophys. Acta, 236, 550 (1971).

87) Henschen,A.
Arkiv Kemi, 22, 347 (1964).

88) Rybáck,M. Brada,Z. Hais,J.M.,
Säulenchromatographie an Ionenaustauschern, VEB Fischer, Jena, (1966).

89) Sanger,F.,
Biochem. J., 39, 507 (1945).

90) Edman,P.,
Acta Chem. Scand., 4, 277 + 283 (1950).

91) Schroeder,W.A.,
Methods in Enzymology, 9, 445 (1967).

92) Stahl,E.,
Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1967).

93) Pataki,G.,
Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie, Walter de Gruyter Verlag, Berlin (1966).

94) Yemm,E.W. Willis,A.J.,
Biochem. J., 57, 508 (1954).

95) Balazs,E.A. Bernstein,K.O. Karossa,J. Swann,D.A.,
Anal. Chem., 12, 559, (1965).

96) Ornstein,L. Davis,B.J.,
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 321 + 404 (1964).

97) Strauch,L.,
Z. anal. Chem., 243, 510 (1968).

98) Shapiro,A.L. Vinuela,E. Maizel Jr,J.V.,
Biochim. Biophys. Res. Commun., 28, 815 (1967).

99) Maurer,H.R.,
Disk-Elektrophorese, Walter de Gruyter Verlag, Berlin (1968).

100) Reisfeld,R.A. Lewis,U.J. Williams,D.E.,
Nature, 195, 281 (1962).

101) Hörmann,H. Bosch van der,J. Rosen von,G.,
Proc. 17th Colloqu. Protids biol. Fluids, Bruges 1969,
H.Peeters ed, Pergamon Press Oxford, p 291, (1970).

102) Fitzgerald,J.E. Schneider,N.S. Waugh,D.F.,
J. Amer. Chem. Soc., 79, 601 (1957).

103) Weber,K. Osborn,M.,
J. Biochem. Chem., 244, 4406 (1969).

104) Mills,D. Karpatkin,D.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 206 (1970).

105) Wuppermann,T. Rosen von,G. Hörmann,H.,
Z. phys. Chem., 352, 1727 (1971).

106) Takagi,T. Iwanaga,S.,
Biochim. Biophys. Acta, 194, 594 (1969).

107) Brummel,M.C. Montgommery,R.,
Anal. Biochemistry, 33, 28 (1970).

108) Gaffney,P.J. Dobos,P.,
Febs Letters, 15, 13 (1971).

109) McKee,P.A. Mattock,P. Hill,R.L.,
Proc. N.A. Sci., 66, 738 (1970).

110) Gollwitzer,R. Timpel,R. Furtmayer,H. Becker,U.,
European J. Biochem. Soc., im Druck, (1972).

111) Plow,E.F. Hougie,C. Edgington,T.S.,
J. Immunology, 107, 1496 (1971).

112) Koch,F.C. McMeekin,T.L.,
J. Amer. Chem. Soc., 46, 2066 (1924).

113) Blombäck,M. Blombäck,B. Mammen,E.F. Prasad,A.A.,
Nature, 218, 134 (1968).

114) Chen,R. Doolittle,R.F.,
Biochemistry, 10, 4486 (1971).

L e b e n s l a u f

Geboren	28. XI. 1936 in Gumbinnen, Ostpreußen, als Sohn des Regierungsrates Dr. Harry von Rosen - von Hoewel und seiner Ehefrau Edith, geb. Steinschen.
Schule	Ab Herbst 1943 sechs verschiedene Volksschulen. Ab Herbst 1948 Besuch des Alten Gymnasium, Bamberg, dann des Beethoven Gymnasium, Bonn, der Otto-Kühne-Schule, Bad Godesberg und der Robert-Blum-Schule, Berlin. Daselbst Erhalt des Reifezeugnisses März 1958.
Universität	Immatrikulation an der Freien Universität, Berlin ab Sommer Semester 1958, dann an der Ludwig-Maximilians-Universität, München, ab Sommer Semester 1961. Anfertigung der Zulassungsarbeit für die Lehramtsprüfung 1962 am Zoologischen Institut unter der Anleitung von Professor Dr. M. Renner. Staatsexamen für das Lehramt an Höheren Schulen in den Fächern Biologie, Chemie (1964) und Erdkunde (1965).
Dissertation	Am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München, unter der Anleitung von Privatdozent Dr. H. Hörmann von Januar 1966 bis September 1969.
Beruf	Ab September 1969 Studienreferendar. Zweites Staatsexamen im Juli 1971. Ab September 1971 städtischer Studienrat in München.